

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Eva Vigato

Povezanost poremećaja spavanja s polimorfizmom gena za serotonin  
prijenosnik i koncentracijom trombocitnog serotonina u ispitanika s  
posttraumatskim stresnim poremećajem

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Dubravke Švob Štrac, više znanstvene suradnice Instituta Ruđer Bošković. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

*Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Dubravki Švob Štrac na predloženoj temi, strpljenju i pomoći tijekom izrade i pisanja diplomskoga rada.*

*Zahvaljujem i djelatnicima Laboratorija za molekularnu neuropsihijatriju koji su mi pomogli prilikom tehničke izvedbe istraživanja.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su mi tijekom studiranja pružili bezuvjetnu ljubav i potporu.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### POVEZANOST POREMEĆAJA SPAVANJA S POLIMORFIZMOM GENA ZA SEROTONINSKI PRIJENOSNIK I KONCENTRACIJOM TROMBOCITNOG SEROTONINA U ISPITANIKA S POSTTRAUMATSKIM STRESNIM POREMEĆAJEM

Eva Vigato

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Post-traumatski stresni poremećaj (PTSP) je kompleksan psihijatrijski poremećaj koji se javlja nakon traumatskog iskustva. Poremećaji spavanja, poput noćnih mora i nesanice, jedno su od glavnih obilježja PTSP-a. Iako neurobiološka podloga PTSP-a nije potpuno jasna, ona uključuje kompleksne interakcije genetskih i okolišnih čimbenika. Serotoninski sustav radi svoje uloge u nadzoru raspoloženja, pobudljivosti i spavanja, važan je za razvoj simptoma PTSP-a. Cilj istraživanja bio je utvrditi moguću povezanost polimorfizma u genu za serotoninski prijenosnik i koncentracije trombocitnog serotonina s poremećajima spavanja u 393 hrvatskih ratnih veterana s PTSP-om. Genotipovi polimorfizma 5-HTTLPR bili su slično raspoređeni u veterana s PTSP-om i u kontrolnim ispitanicima. Raspodjela genotipova polimorfizma 5-HTTLPR bila je također slična u veterana s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije, dok je koncentracija trombocitnog serotonina bila niža u veterana s PTSP-om i komorbidnom depresijom u usporedbi s onima bez komorbidne depresije. Veća koncentracija trombocitnog serotonina i veća učestalost LL genotipa polimorfizma 5-HTTLPR u usporedbi s nositeljima S alela utvrđena je u veterana s PTSP-om sa simptomima rane nesanice u usporedbi s veteranima bez rane nesanice. S druge strane, različiti poremećaji spavanja nisu bili značajno povezani s genotipovima polimorfizma 5-HTTLPR ili s promijenjenom koncentracijom trombocitnog serotonina u veterana s PTSP-om i komorbidnom depresijom.

(46 stranica, 8 slika, 14 tablica, 63 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: PTSP, depresija, poremećaji spavanja, trombocitni serotonin, serotoninski prijenosnik, 5-HTTLPR polimorfizam

Voditelj: Dr. sc. Dubravka Švob Štrac, viša znan. suradnica, IRB

Su-voditelj: Dr. sc. Julija Erhardt, znan. suradnica, PMF

Ocjenitelji: Dr. sc. Julija Erhardt; znan. suradnica; Dr. sc. Jasna Lajtner, izv. prof.; Dr. sc.

Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Rad je prihvaćen: 18. srpnja 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

### THE ASSOCIATION OF SLEEP DISTURBANCES WITH SEROTONIN TRANSPORTER GENE POLYMORPHISM AND PLATELET SEROTONIN CONCENTRATION IN SUBJECTS WITH POST-TRAUMATIC STRESS DISORDER

Eva Vigato

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD) is a complex psychiatric disorder that develops after traumatic experience(s). Sleep disorders, including nightmares and insomnia, are one of the main features of PTSD. Although the neurobiological basis of PTSD is unclear, it involves complex interactions of genetic and environmental factors. Due to its role in controlling mood, arousal, and sleep, serotonin system is important for development of PTSD symptoms. The aim of the study was to determine the possible association of serotonin transporter gene polymorphism and platelet serotonin concentration with sleep disorders in 393 Croatian war veterans with PTSD. 5-HTTLPR polymorphism genotypes were similarly distributed in veterans with PTSD and control subjects. The distribution of 5-HTTLPR polymorphism genotypes was similar in veterans with PTSD with and without comorbid depression, while platelet serotonin concentrations were lower in veterans with PTSD and comorbid depression in comparison to veterans without comorbid depression. Higher platelet serotonin concentration and higher incidence of LL 5-HTTLPR polymorphism genotypes compared to S alleles was found in veterans with PTSD with symptoms of early insomnia compared to veterans without early insomnia. In veterans with PTSD and comorbid depression various sleep disorders were not associated with 5-HTTLPR polymorphism genotypes or with altered platelet serotonin concentration.

(46 pages, 8 figures, 14 tables, 63 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: PTSD, depression, sleep disorders, platelet serotonin, serotonin transporter, 5-HTTLPR polymorphism

Supervisor: Dubravka Švob Štrac, PhD, Senior Research Associate, Rudjer Boskovic

Institute

Co-supervisor: Julija Erhardt, PhD, Research Associate, Faculty of Science, Zagreb

Reviewers: Julija Erhardt, PhD, Research Associate; Jasna Lajtner, PhD, Assoc. Prof.; Željka Vidaković-Cifrek, PhD, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 18<sup>th</sup> July 2017.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Post-traumatski stresni poremećaj (PTSP).....	1
1.2. Spavanje.....	2
1.2.1. Poremećaji spavanja u PTSP-u.....	2
1.3. Serotoninski sustav.....	3
1.3.1. Serotoninski prijenosnik.....	5
1.3.1.1. Gen za serotoninski prijenosnik i njegovi polimorfizmi.....	5
1.3.1.2. 5-HTTLPR polimorfizam.....	6
1.4. Serotoninski sustav i PTSP.....	8
1.5. Serotoninski sustav i spavanje.....	8
1.6. Istraživanja povezanosti polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotoninski prijenosnik i koncentracije trombocitnog serotonina s PTSP-om i spavanjem.....	10
1.7. Cilj istraživanja.....	11
2. MATERIJALI I METODE.....	12
2.1. Ispitanici.....	12
2.2. Određivanje koncentracije serotonina u trombocitima.....	14
2.3. Određivanje koncentracije proteina.....	15
2.4. Izolacija DNA iz krvi.....	16
2.5. Lančana reakcija polimerazom.....	17
2.6. Elektroforeza na gelu agaroze.....	19
2.7. Statistička analiza podataka.....	21
3. REZULTATI.....	22
3.1. Demografski i klinički podaci ispitanika.....	22
3.2. Učestalost pojavljivanja genotipova 5-HTTLPR polimorfizma u genu za serotoninski prijenosnik u ratnih veterana s PTSP-om.....	23
3.3. Koncentracija trombocitnog serotonina i učestalost pojavljivanja genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u veterana s PTSP-om sa ili bez teškoća spavanja.....	25
3.3.1. Veterani s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije podijeljeni u grupe sa ili bez teškoća spavanja prema točkama 4, 5 i 6 HDRS ljestvice.....	25
3.3.2. Veterani s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije podijeljeni u grupe sa ili bez teškoća spavanja prema točki 4 HAMA ljestvice.....	30

3.3.3. Veterani s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije podijeljeni u grupe sa ili bez teškoća spavanja prema kriteriju B2 i D1 CAPS ljestvice.....	31
4. RASPRAVA.....	33
5. ZAKLJUČAK.....	39
6. LITERATURA.....	40
7. ŽIVOTOPIS.....	46

## POPIS KRATICA

ACD: Engl. *Acid Citrate Dextrose*

ANOVA: Jednosmjerna analiza varijance

bp: Parovi baza; engl. *base pair*

BSA: Albumin iz goveđeg seruma; engl. *Bovine Serum Albumin*

CAPS: Klinička skala za posttraumatski stresni poremećaj

DNA: Deoksiribonukleinska kiselina

DSM-IV: Dijagnostički i statistički priručnik za mentalne poremećaje, četvrta revizija

EDTA: Etilendiamintetraoctena kiselina; engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*

HAMA: Hamiltonova skala za anksioznost

HDRS: Hamiltonova skala za depresiju

HHN: os hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda

$\chi^2$ -test: Hi-kvadrat test

kHz: Kiloherc

L alel: Dugački alel; engl. *long allele*

MAO: Monoaminooksidaza

Non REM ili NREM faza spavanja: Engl. *non-rapid eye movement*

OPT - ortoftalaldehid

p: statistička vjerojatnost

PCR: Lančana reakcija polimerazom; engl. *polymerase chain reaction*

5-HIAA: 5-hidroksiindoloctena kiselina; engl. *5-hydroxyindoleacetic acid*

5-HT: 5-hidroksitriptamin (serotonin)

5-HT<sub>1</sub> receptori: Serotoninski receptori tipa 1

5-HT<sub>2</sub> receptori: Serotoninski receptori tipa 2

5-HT<sub>3</sub> receptori: Serotoninski receptori tipa 3

5-HT<sub>4</sub> receptori: Serotoninski receptori tipa 4

5-HT<sub>5</sub> receptori: Serotoninski receptori tipa 5

5-HT<sub>6</sub> receptori: Serotoninski receptori tipa 6

5-HT<sub>7</sub> receptori: Serotoninski receptori tipa 7

5-HTP: 5-hidroksitriptofan

5-HTT: 5-HT transporter odnosno Serotoninski prijenosnik

5-HTTLPR: Polimorfizam serotoninskog prijenosnika, Polimorfna regija vezana za gen za serotoninski prijenosnik; engl. *5-HTT gene linked polymorphic region*



PMF: Prirodoslovno-matematički fakultet

PRP: Plazma bogata trombocitima; engl. *platelet rich plasma*

PTSP: Posttraumatski stresni poremećaj

R: Standardizirani reziduali

re H<sub>2</sub>O – redestilirana (deionizirana) voda

REM faza spavanja: Engl. *rapid eye movement*

RCLB: Pufer za lizu eritrocita; engl. *red cells lysis buffer*

S alel: Kratki alel; engl. *short allele*

SCID: strukturirani klinički intervju

SE pufer: Engl. *sodium-EDTA buffer*

SD: Standardna devijacija

SDS: Natrij dodecil sulfat; engl. *sodium dodecyl sulfate*

SIPUS: Selektivni inhibitori ponovnog unosa serotonina; engl. *selective serotonin reuptake inhibitors-SSRIs*

SLC6A4: Gen za serotonininski prijenosnik

SŽS: Središnji živčani sustav

TAE pufer: Tris-acetat-EDTA pufer

TE pufer: Tris-EDTA pufer

Trp: triptofan

UV: Ultraljubičasto; eng. *ultraviolet*

VNTR: Varijabilni broj ponavljajućih sljedova, engl. *variable number of tandem repeats*

# 1. UVOD

## 1.1. Post-traumatski stresni poremećaj (PTSP)

Post-traumatski stresni poremećaj (PTSP) je stanje koje se razvija nakon izlaganja traumatskim događajima koji su opasni po život. Klasični simptomi uključuju ponovno proživljavanje traume preko noćnih mora ili prisjećanja, izbjegavanje podražaja koji se povezuje s traumatskim događajem i povećanu pobuđenost. Kod ponovnog proživljavanja traume (engl. *flashbacks*) oboljeloj osobi čini se kao da se traumatični događaj događa ispred nje, zbog čega se gubi na način da ne razlikuje zbivanja u sadašnjosti od onih u prošlosti. Izbjegavanje podražaja se očituje na način da oboljela osoba izbjegava sve one aktivnosti koje je mogu podsjetiti na taj događaj, jer se boji da bi to moglo izazvati uznemirujuće osjećaje. Kako bi blokirala sjećanja koja je vraćaju u ponovno proživljavanje traume, oboljela osoba često prekomjerno upotrebljava ili zloupotrebljava alkohol i droge. Povećana pobuđenost očituje se kao poteškoće u uspavljivanju ili spavanju. Javlja se razdražljivo ponašanje i bijesni ispadi (nakon malo ili bez provokacije) obično izraženi kao verbalna ili fizička agresija prema ljudima ili objektima. Javlja se i strah od gubitka kontrole. Isto tako, bolesnici se otežano koncentriraju i pokazuju pojačan oprez (pretjeranu pažnju na vanjske podražaje izvan realističnog očekivanog stupnja vanjske prijetnje). Kako bi se dijagnosticirao PTSP, trajanje ovih simptoma mora biti duže od jednog mjeseca. Zbog simptoma se javljaju problemi u društvenim, profesionalnim i drugim važnim područjima života (American Psychiatric Association, 2013). PTSP se može pojaviti u bilo kojoj dobi, počevši od prve godine života. Simptomi se obično javljaju prva tri mjeseca nakon traume iako može doći do odgode simptoma mjesecima, čak i godinama prije nego što se zadovolje dobiveni kriteriji za dijagnozu. Trajanje simptoma PTSP-a može varirati od potpunog oporavka 3 mjeseca nakon pojavljivanja (kod otprilike polovine odraslih), do zadržavanja simptoma više od 12 mjeseci, a ponekad čak i više od 50 godina. Vraćanje simptoma ili povećanje njegova intenziteta može se javiti kao odgovor na životne stresove, događaje koji podsjećaju na originalnu traumu ili nove traumatske događaje. PTSP je češći kod žena nego kod muškaraca te one u općoj populaciji doživljavaju PTSP dužeg trajanja nego muškarci. Barem dio povećanog rizika za PTSP u žena javlja se zbog češće izloženosti traumatičnim događajima kao što je silovanje i nasilje. Unutar populacija specifično izloženih takvim stresorima, spolne razlike su smanjene ili nevažne. PTSP se često udružuje s drugim poremećajima pa je tako kod pojedinaca s PTSP-om, 80 % veća učestalost javljanja simptoma koji ispunjavaju dijagnostički kriterij za bar još jedan mentalni poremećaj (na primjer depresivni, bipolarni i anksiozni poremećaj) (American Psychiatric Association, 2013).

Neurobiološka podloga PTSP-a nije potpuno jasna. Glavne endokrine karakteristike koje se povezuju s PTSP-om su poremećena regulacija kortizola i tiroidnih hormona. Središnji koordinator sustava neuroendokrinog stresnog odgovora je os hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HHN) te se kao takva najviše proučava. U nastanak PTSP-a uključene su i promjene neurotransitorskih sustava. One uključuju poremećenu regulaciju serotonina, kateholamina, aminokiselina, peptida i opioidnih neurotransmitora. Ti neurotransmitori su nađeni u moždanim krugovima koji reguliraju odgovore vezane za stres i strah (Sherin i Nemeroff, 2011).

## **1.2. Spavanje**

San je fiziološka pojava koja se izmjenjuje sa stanjem budnosti u okviru ritma dana i noći, a služi odmaranju i oporavku organizma. Ljudsko spavanje može se podijeliti u NREM (eng. *non-rapid eye movement*) i REM (eng. *rapid eye movement*) fazu. Normalno spavanje sastoji se od organiziranog uzorka NREM-REM ciklusa, pri čemu svaki ciklus traje između 70 i 120 minuta. NREM spavanje se može podijeliti u četiri stupnja (stupnjevi 1, 2, 3 i 4) tijekom kojih se san progresivno produbljuje. Stupnjevi 3 i 4 su najdublji stupnjevi spavanja te se u tom razdoblju najteže probuditi. REM spavanje je karakterizirano brzim pokretima očiju. U toj fazi je mozak najaktivniji, ali je tijelo paralizirano. Tada se relativno lako probuditi. Najviše se snova javlja u REM fazi iako se mogu javiti i u drugim stupnjevima spavanja. U tipičnom noćnom spavanju normalne mlade odrasle osobe, stupnjevi 3 i 4 su najčešći u prvoj trećini noći, dok se REM epizode tijekom noći dužinom povećavaju. Prema tome, omjer REM spavanja puno je veći u zadnjoj trećini noći. Normalni uzorci spavanja mijenjaju se tijekom životnog ciklusa. Prosječno vrijeme sna smanjuje se od oko 16-18 sati u 24-satnom ciklusu u ranom djetinjstvu, 10-11 sati u kasnijem djetinjstvu, 7-9 sati u srednjim dvadesetima godinama do 6-8 sati u srednjim godinama. Noćno spavanje se dalje smanjuje u starijih odraslih, ali postoji povećanje u dnevnom drijemanju (Harvey *i sur.*, 2003).

### **1.2.1. Poremećaji spavanja u PTSP-u**

Nema sumnje da nakon izlaganja traumatičnom događaju dolazi do problema u spavanju. No, dok su za većinu ljudi poteškoće u spavanju nakon traume prolazne, za druge one postaju trajni problem. Poremećaji spavanja su jedan od tipičnih simptoma PTSP-a. Nesanica ili insomnija i noćne more su neovisno povezane s PTSP-om te uključuju specifične simptome u njegovom dijagnostičkom kriteriju. Insomnija se javlja u 60-90 % pacijenata s PTSP-om i najčešći je potvrđen simptom PTSP-a, a noćne more javljaju se manje često (~50 %) (Pigeon *i sur.*, 2013).

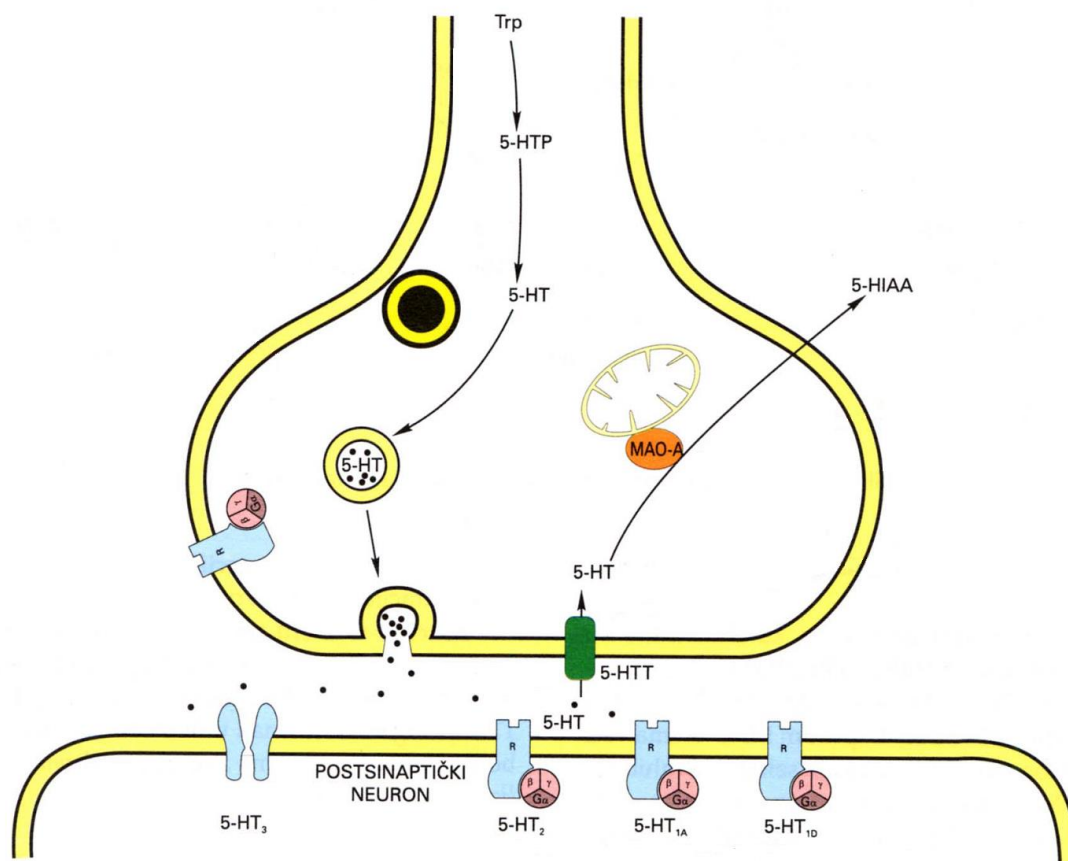
Nakon traumatičnog događaja, cijeli spektar simptoma PTSP-a obično zahtijeva nekoliko mjeseci za razvoj. Tijekom tog vremena, poremećaji spavanja kao što je insomnija, noćne more i fragmentirani REM san predviđaju kasniji razvoj simptoma PTSP-a. Poremećaj sna mogao bi rezultirati iz neuspjeha da se potisnuta memorija održava i generalizira (Pace-Schott *i sur.*, 2015). Poremećaji spavanja često se javljaju akutno nakon izlaganja traumatičnom događaju (Harvey *i sur.*, 2003). Jednom prisutni, poremećaji spavanja često postaju dugoročni, kao što je primjećeno kod preživjelih holokausta (Kuch i Cox, 1992).

### 1.3. Serotoninski sustav

Do tada neidentificirani serumski čimbenik sposoban izazvati vazokonstrikciju, 1948. godine nazvan je serotoninom kako bi se ukazalo na njegovo podrijetlo iz krvnog seruma i njegov utjecaj na vaskularni mišićni ton. Daljne kemijske analize otkrile su da je molekula serotonina zapravo 5-hidroksitriptamin (5-HT) i da je blisko povezana s esencijalnom aminokiselinom triptofanom koja je prekursor 5-HT. Uskoro se otkrilo da je 5-HT prisutan i u mozgu.

Danas se smatra da se 90 % 5-HT u ljudskom tijelu nalazi u mukoznim membranama gastrointestinalnog sustava, 8-10 % u trombocitima i 1-2 % u središnjem živčanom sustavu (SŽS). Kako bi se aktivno transportirao u mozak, serotoninski prekursor L-triptofan natječe se s ostalim velikim, neutralnim aminokiselinama razgranatih lanaca za proteinski nosač. Serotonergični neuroni sadrže sve proteine potrebne za sintezu 5-HT npr. enzim triptofan-hidroksilazu. Novoformirani 5-HT se akumulira u sinaptičkim vezikulama gdje je zaštićen od metabolizirajućeg enzima monoaminooksidaze (MAO). Depolarizacijom živčane stanice dolazi do oslobađanja 5-HT u sinaptičku pukotinu gdje djeluje na postsinaptičke serotoninske receptore. Nakon prolaska živčanog signala otpušteni 5-HT se učinkovito uklanja iz sinapse razgradnjom pomoću MAO, ali uglavnom se pomoću visoko afinitetnih presinaptičkih 5-HT prijenosnika (5-HTT) ovisnih o natriju unosi u presinaptički živčani završetak (slika 1). Tijela serotonergičnih neurona smještena su u dorzalnim i medijalnim jezgrama rafe u moždanom deblu te pružaju svoje aksone u mnoge regije prednjeg mozga, uključujući amigdal, intersticijske jezgre strije terminalis, hipokampus, hipotalamus i prefrontalni korteks. Serotonin ima ulogu u reguliranju spavanja, apetita, spolnog ponašanja, agresije/impulzivnosti, motornih funkcija, analgezije i neuroendokrinih funkcija (Sherin i Nemeroff, 2011). Široki raspon fizioloških učinaka serotonin ostvaruje putem različitih podtipova serotoninskih receptora. Istraživanja su pokazala da su podtipovi 5-HT receptora kodirani različitim genima te su različito raspodijeljeni u SŽS (Landolt i Wehrle, 2009). U obitelji serotoninskih receptora

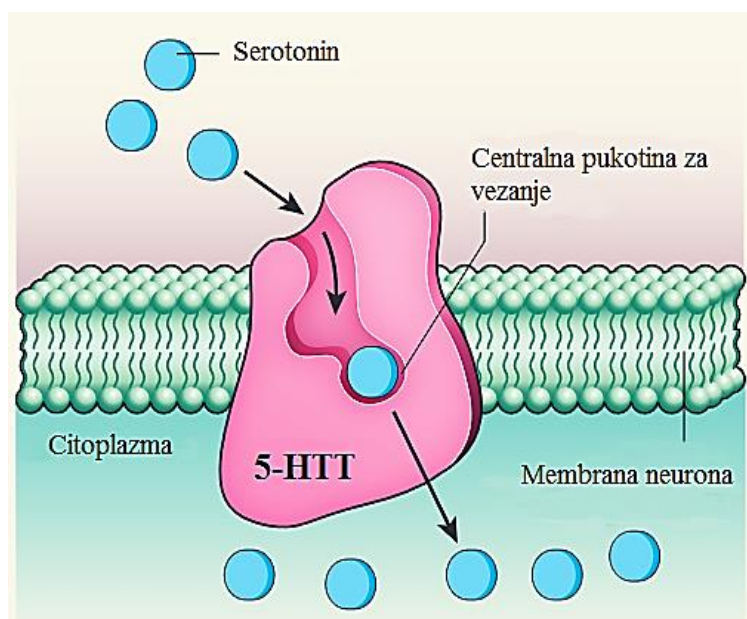
pripada sedam glavnih podtipova receptora, nazvanih 5-HT1-7. 5-HT4, 5-HT6 i 5HT7 su receptori koji imaju po jedan podtip dok se ostale klase receptora sastoje od pet (5-HT1A-B-D-E-F), tri (5-HT2A-B-C) ili dva (5-HT3A-B i 5-HT5A-B) podtipa receptora. Svi 5-HT receptori vezani su za G proteine s iznimkom 5-HT3 receptora koji je ligandom posredovan ionski kanalić. Nadalje, svi 5-HT receptori stvaraju ekscitacijske odgovore osim 5-HT1 i 5-HT5 receptora koji stvaraju inhibicijske odgovore (Sangare i sur., 2016).



Slika 1. Serotonin (5-HT) i njegovi putevi sinteze, pohrane, otpuštanja, razgradnje i ponovnog unosa. Novoformirani 5-HT se pohranjuje u sinaptičkim vezikulama. Depolarizacijom živčane stanice dolazi do oslobađanja 5-HT u sinaptičku pukotinu gdje djeluje na postsinaptičke serotonininske receptore. Nakon prolaska živčanog signala otpušteni 5-HT se uklanja iz sinapse razgradnjom pomoću MAO, ali uglavnom se pomoću presinaptičkih 5-HT prijenosnika (5-HTT) unosi u presinaptički živčani završetak. Kratice: triptofan (Trp), 5-hidroksitriptofan (5-HTP), serotonin (5-HT), serotoniniski prijenosnik (5-HTT), monoaminoooksidaza A (MAO-A), 5-hidroksiindoloctena kiselina (5-HIAA) (preuzeto i prilagođeno iz Judaš i Kostović, 2001).

### 1.3.1. Serotoninski prijenosnik

Serotoninski prijenosnik (5-hidroksitriptaminski prijenosnik, 5-HTT) nalazi se na završecima serotonergičnih aksona i na membrani trombocita. Transportira 5-HT iz sinaptičke pukotine natrag u presinaptičke neurone (slika 2). Ovaj transport zaustavlja djelovanje serotonina u sinaptičkoj pukotini. Na membrani trombocita služi za unos 5-HT iz krvi u trombocite jer za razliku od neurona, trombociti nemaju sposobnost sinteze 5-HT, već akumuliraju 5-HT sintetiziran u enterokromafinim stanicama sluznice tankog crijeva.



Slika 2. Serotoninski prijenosnik (5-HTT) i prijenos serotonina preko membrane neurona (preuzeto i prilagođeno iz Caron i Gether, 2016)

#### 1.3.1.1. Gen za serotoninski prijenosnik i njegovi polimorfizmi

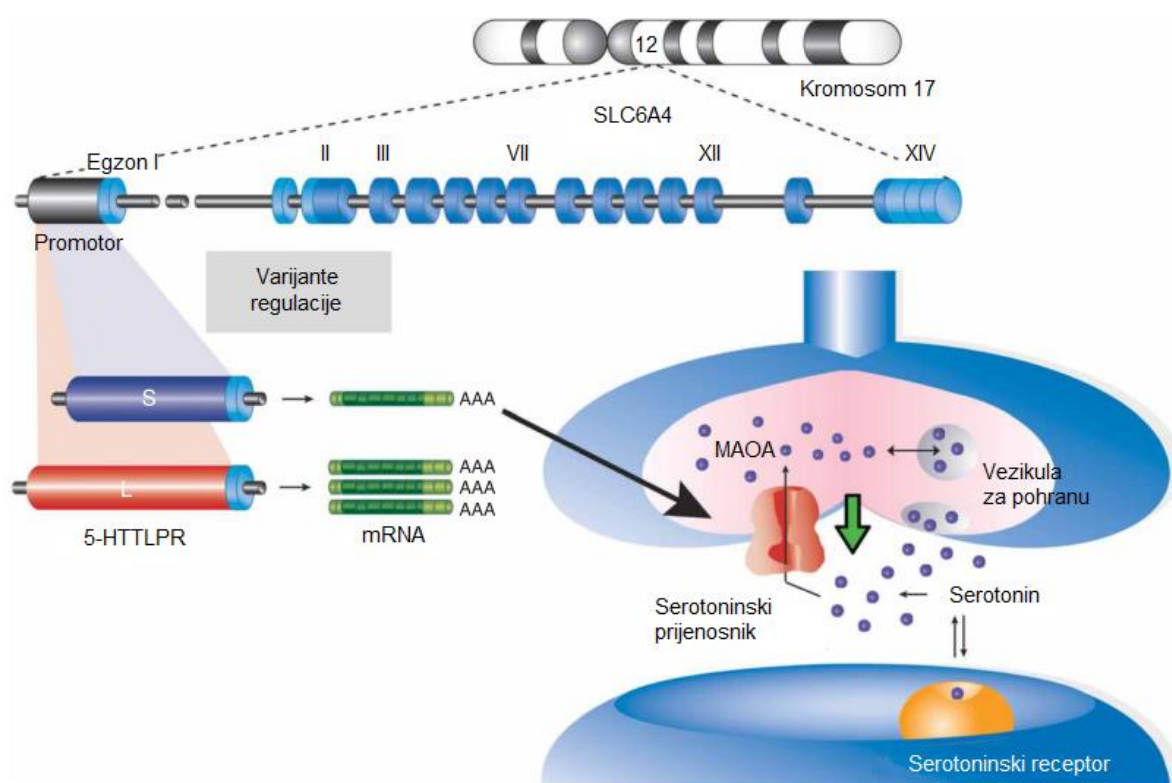
Gen za serotoninski prijenosnik (*SLC6A4*) smješten je na 17. kromosomu (regija q11.1-q12). Postoje dva česta polimorfizma tog gena za koje se istovremeno smatra da su funkcionalni (Lesch i Gutknecht, 2005). To su:

1) polimorfizam u 2. intronu: polimorfizam koji uključuje varijabilni broj ponavljajućih sljedova (engl. *variable number of tandem repeats*, VNTR) veličine 17 parova baza (tzv. polimorfizam VNTR-17 serotoninskog prijenosnika). Kod ovog polimorfizma javljaju se tri alela i to alel s 9 ponavljanja (Stin 2.9), alel s 10 ponavljanja (Stin 2.10) te alel s 12 ponavljanja (Stin 2.12).

2) polimorfizam u promotoru: polimorfna regija vezana za gen *5-HTT* (engl. *5-HTT gene linked polymorphic region*, *5-HTTLPR*).

### 1.3.1.2. 5-HTTLPR polimorfizam

5-HTTLPR je polimorfizam u promotorskoj regiji gena koji kodira za 5-HTT. Polimorfno mjesto nalazi se oko 1 kb uzvodno od inicijacijskog mjesta transkripcije gena za 5-HTT. Prisutno je 16 kopija ponavljajućeg elementa, a s obzirom na polimorfizam, najčešći su aleli s 14 ponavljajućih jedinica ili kratki (engl. *short* – S) alel te alel sa 16 ponavljajućih jedinica ili dugi (engl. *long* – L) alel (slika 3). Kod kratkog ili S alela prisutna je delecija od 44 bp, a kod dugog L alela insercija istog slijeda. Znaju se javiti i aleli s 15, 18, 19, 20 ili 22 kopije ponavljajućeg slijeda, kao i varijante s delecijama ili insercijama te supstitucijama jednog nukleotida unutar ponavljajuće jedinice (Lesch i Gutknecht, 2005). Iako su se prvotno intenzivno istraživale dvije originalne varijante (S i L) 5-HTTLPR polimorfizma, 2006. godine otkrilo se da je 5-HTTLPR polimorfizam funkcionalno trialelan. Saznalo se da supstitucija jedne baze u L alelu (A→G) donosi L<sub>G</sub> alel koji je funkcionalno ekvivalentan S alelu (Hu i sur., 2006).



Slika 3. Prikaz dugačkog/kratkog polimorfizma gena SLC6A4 te otpuštanja, primanja i recikliranja serotonina u neuronima (preuzeto i prilagođeno iz Canli i Lesch, 2007).

Ovaj polimorfizam utječe na regulaciju transkripcijske aktivnosti gena *5-HTT*. Utvrđeno da je prisutnost L alela polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik povezana s učinkovitijom ekspresijom tog gena nego u slučaju kad je prisutan S alel polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik. Isto tako, pokazalo se da je bazalna aktivnost 5-HTT kod osoba s L alelom polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik dvostruko viša nego kod osoba s S alelom (Lesch *i sur.*, 1996). Pronađeno je da su mnogi psihijatrijski poremećaji, kao što su afektivni poremećaji (Furlong *i sur.*, 1998) i anksiozne crte ličnosti (Lesch *i sur.*, 1996), povezani s prisutnošću S alela 5-HTTLPR polimorfizma u genu za serotonininski prijenosnik. Vjeruje se da su SS homozigoti osjetljiviji na stres, zbog čega mogu razviti poremećene odgovore na stresore. U vrijeme izlaganja podražajima koji izazivaju strah, SS homozigoti su pokazali pojačanu živčanu aktivnost u amigdali u usporedbi s LL homozigotima. Smatra se da SS homozigoti imaju sniženu 5-HTT funkciju i višu 5-HT koncentraciju u sinapsi i radi toga pokazuju višu razinu anksioznosti i straha te imaju veću aktivaciju amigdale pri odgovoru na stresne podražaje nego LL homozigoti, koji imaju nižu koncentraciju 5-HT u sinapsi i radi toga pokazuju nižu razinu anksioznosti i straha. Osim navedenog, SS homozigoti su pokazali značajno smanjeni volumen sive tvari u prednjem cingulatnom korteksu i amigdali (Hariri *i sur.*, 2002). Kako SS homozigoti pretjerano reagiraju na negativne podražaje i imaju hiperaktivnu amigdalnu, mogli bi češće razviti anksiozne poremećaje, a tako i PTSP. Odnosno, imaju više anksioznih crta ličnosti. Hipoteza je da pojačana aktivnost amigdale može dovesti do pojačane osjetljivosti na stresne životne događaje i razvoja anksioznih poremećaja, poremećaja raspoloženja, psihosomatskih poremećaja i/ili alkoholizma (Serretti *i sur.*, 2006). Istraživanja su pokazala da je raspodjela genotipova polimorfizma 5-HTTLPR ovisna o rasi i etnicitetu. Naime, unutar pripadnika bijele rase pokazane su značajne razlike u učestalosti pojavljivanja S i L alela i SS, LS i LL genotipova 5-HTTLPR polimorfizma u genu za serotonininski prijenosnik između različitih etničkih skupina (Noskova *i sur.*, 2008). Osim etničkih, postoje i rasne razlike u raspodjeli alela. Tako je L alel 5-HTTLPR polimorfizma u genu za serotonininski prijenosnik utvrđen u oko 70 % Afrikanaca i američkih Indijanaca, oko 50 % Europljana i oko 30 % Japanaca (Gelenter *i sur.*, 1999). Membrane trombocita, kao i neuroni u živčanom sustavu, također sadrže 5-HTT i oni se kodiraju istom kopijom gena. Zajedno s vezikularnim prijenosnikom oni su odgovorni za unos i nakupljanje serotonina otpuštenog iz gastrointestinalnih enterokromafinih stanica u krv. Istraživanjima se pokazalo da je unos 5-HT u trombocite i moždane sinaptosome u značajnoj korelaciji. Zato se trombociti mogu koristiti kao periferni pokazatelji 5-HT metabolizma (Ehrlich *i sur.*, 2010).



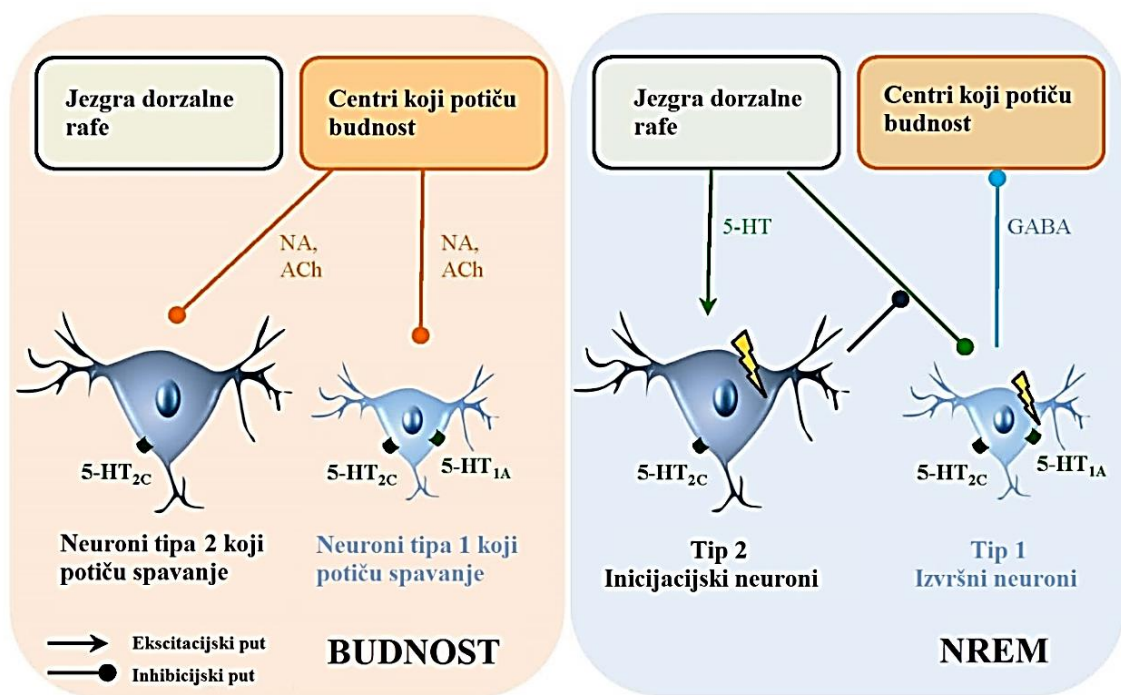
#### 1.4. Serotoninski sustav i PTSP

Uloga serotoninskog sustava u patofiziologiji PTSP-a još uvijek je nejasna, ali smatra se da 5-HT ima ulogu u razvoju simptoma PTSP-a radi svoje uloge u nadzoru raspoloženja, pobudljivosti i spavanja (Jacobs, 1991), radi kliničke sličnosti PTSP-a i drugih psihijatrijskih poremećaja i poremećaja ponašanja koji su povezani s promjenama u 5-HT funkciji (Brady *i sur.*, 2000) te zbog kliničke djelotvornosti lijekova koji povećavaju serotonergičnu neurotransmisiju, kao što su selektivni inhibitori ponovnog unosa serotonina (hrv. SIPUSi) (engl. *selective serotonin reuptake inhibitors – SSRIs*) u liječenju PTSP-a (Davis *i sur.*, 1999). Serotonin je uključen u modulaciju afektivnih i stresnih odgovora, a time ima ulogu i u PTSP-u. Iako mehanizmi nisu posve jasni, utjecaj 5-HT na afektivne i stresne odgovore varira ovisno o intenzitetu stresora, regiji mozga i tipu receptora. Vjeruje se da 5-HT neuroni dorzalne rafe upravljaju anksioznim učincima preko 5-HT<sub>2</sub> receptora i njihovim projekcijama u amigdalnu i hipokampus. S druge strane, za 5-HT neurone iz medijalnih rafa smatra se da upravljaju anksiolitičkim učincima, potiču uništenje i inhibiraju kodiranje zapamćenih asocijacija preko 5-HT<sub>1A</sub> receptora. U životinjskim modelima, kronična izloženost stresorima potiče ekspresiju 5-HT<sub>2</sub> receptora, a inhibira ekspresiju 5-HT<sub>1A</sub> receptora (Sherin i Nemeroff, 2011).

#### 1.5. Serotoninski sustav i spavanje

Uloga serotonina u regulaciji spavanja kompleksna je tema rasprave preko 60 godina, posebno zbog toga što ovaj neurotransmiter igra veliku ulogu u više fizioloških funkcija uključujući apetit, gastrointestinalnu pokretljivost, termoregulaciju, nocicepciju, emocije i kogniciju (Sangare *i sur.*, 2016). Kao neurotransmiter koji djeluje na mnoge različite receptore, serotonin bi mogao biti uključen u mnoge procese važne za kontrolu spavanja i buđenja, ovisno o lokalizaciji u mozgu, tipu receptora na koji djeluje i o samom stanju pojedinca (Ursin, 2002). Povezanost između 5-HT i spavanja prvi put je zabilježena 1950-ih, kada se nakon injekcije rezerpina koji reverzibilno blokira vezikularni prijenosnik serotonina u mozgu javio sedativni učinak paralelno sa smanjenjem serotonina u mozgu. U narednom desetljeću, pokazalo se da uništenje serotonergične jezgre i inhibicija sinteze serotonina pomoću p-klorofenilalanina potiču insomniju, podupirući povezanost 5-HT i indukcije spavanja. Ipak, *in vivo* istraživanja neurona rafe tijekom ciklusa spavanja i buđenja opovrgnula su ulogu serotonergičnih neurona u regulaciji NREM faze s obzirom na to da se električna aktivnost 5-HT neurona u jezgri rafe smanjuje u frekvenciji tijekom NREM faze u usporedbi s budnim stanjem (Sangare *i sur.*, 2016). Poslije se pokazalo da ne smanjuju svi neuroni rafe svoju aktivnost tijekom spavanja. Studije atipičnih serotonergičnih neurona u jezgri dorzalne rafe pokazale su da neki od njih

imaju neprekidnu aktivnost tijekom REM faze, dok su neki pokazali najvišu frekvenciju okidanja tijekom NREM faze, a supresiju aktivnosti u budnom stanju i REM fazi (Sakai i Crochet, 2001). Ventrolateralna preoptička jezgra glavna je neurološka struktura koja potiče NREM spavanje, a smještena je u preoptičkom području hipotalamusa. Ova struktura stvara inhibicijske veze sa strukturama koje potiču buđenje. U njoj se nalaze neuroni odgovorni za početak spavanja koji predstavljaju homogenu populaciju stanica. One se inhibiraju neurotransmitorima koji potiču buđenje kao što su noradrenalin i acetilkolin (Gallopín *i sur.*, 2000). Za razliku od ostalih neurotransmitora koji potiču buđenje, za serotonin se pokazalo da potiče suprotne odgovore u toj regiji. Ventrolateralna preoptička jezgra sastoji se od dva podtipa neurona koji potiču spavanje, a koji se razlikuju prema odgovoru na serotonin pa tako unosom serotonina *ex vivo* postaju ili inhibirani (tip 1) ili ekscitirani (tip 2). Vjeruje se da bi neuroni tipa 2 mogli imati ulogu u inicijaciji, a tipa 1 u održavanju NREM spavanja (Gallopín *i sur.*, 2005). Neuroni tipa 2, koji se mogu više ekscitirati, vjerojatno prvi odgovaraju na serotonergični ekscitacijski signal. Zatim bi njihova aktivacija mogla smanjiti učestalost serotoninске inhibicije neurona tipa 1. Neuroni tipa 1 tada bi mogli inhibirati sustav buđenja i omogućiti održavanje NREM spavanja (slika 4). Primjenom metode RT-PCR pokazalo se da neuroni koji potiču spavanje imaju mRNA ekspresiju specifičnih podtipova 5-HT receptora. Neuroni tipa 1 ekspimiraju 5-HT<sub>1A, B, D, F</sub> podtipove receptora, a oba neuralna tipa ekspimiraju 5-HT<sub>2A-C, 4, 7</sub> podtipove receptora. Pokazano je da je za ekscitacijski odgovor na 5-HT djelomično odgovorna aktivacija 5-HT<sub>2C</sub> receptora u neuronima tipa 2, a za inhibicijski odgovor na 5-HT u neuronima tipa 1 odgovorna je aktivacija 5-HT<sub>1A</sub> receptora (Sangare *i sur.*, 2016).



Slika 4. Model povezanosti između centara koji potiču budnost, serotoninskih jezgara rafe i neurona koji potiču buđenje u ventrolateralnoj preoptičkoj jezgri. Kratice: acetilkolin (ACh), gama-aminomaslačna kiselina (GABA), noradrenalin (NA), serotonin (5-HT) (preuzeto i prilagođeno iz <https://atlasofscience.org/serotonin-and-sleep-regulation-cellular-and-molecular-mechanisms/>).

#### 1.6. Istraživanja povezanosti polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotoninski prijenosnik i koncentracije trombocitnog serotonina s PTSP-om i spavanjem

Pokazano je da su pojedine varijante gena za serotoninski prijenosnik s obzirom na 5-HTTLPR polimorfizam povezane s razvojem PTSP-a, ali su rezultati vrlo kontradiktorni. Za S alel se je utvrdilo da povećava rizik za PTSP u istraživanju provedenom na izbjeglicama koje su preživjele genocid u Ruandi (Kolassa *i sur.*, 2010) i kod borbenih veterana (Wang *i sur.*, 2011). S druge strane, u istraživanju na općoj populaciji, nađena je značajna korelacija između pojavljivanja L alela i PTSP-a (Grabe *i sur.*, 2009). U meta-analizi iz 2013. godine nije utvrđena značajna povezanost između polimorfizma 5-HTTLPR i PTSP-a (Navarro-Mateu *i sur.*, 2013). Za S alel 5-HTTLPR polimorfizma se pokazalo da je povezan s lošijom kvalitetom sna kod ljudi koji su izloženi kroničnom stresu zbog njegovanja partnera ili roditelja s demencijom (Brummett *i sur.*, 2007). Kod zdravih radnika Kineskog podrijetla, S alel je uz stres na poslu bio rizični čimbenik za razvoj insomnije (Huang *i sur.*, 2014). Također, S alel bio je češće zastupljen u pacijenata koji imaju dijagnozu primarne insomnije (Deuschle *i sur.*, 2010). S druge strane, u istraživanju na općoj populaciji, LL homozigoti imali su značajno

lošiju kvalitetu sna nego nositelji barem jednog S alela. Rezultati tog istraživanja mogli bi se objasniti time da je S alel više povezan sa poremećajima spavanja kod populacija s mentalnim poremećajima (Barclay *i sur.*, 2011). Kod muškaraca u kineskoj Han populaciji, našla se povezanost između L alela i apneje u snu (Yue *i sur.*, 2008). Razina stresa utječe na insomniju te je kod zdravih kineskih radnika s niskim, ali ne i visokim razinama stresa na poslu, S alel pokazivao protektivan učinak na insomniju (Huang *i sur.*, 2014). Značajno niža koncentracija 5-HT u trombocitima nađena je kod radnika koji rotiraju smjene u odnosu na radnike koji rade samo po danu (Sookoian *i sur.*, 2007). Također, smanjena koncentracija 5-HT u trombocitima utvrđena je kod alkoholičara s insomnijom u odnosu na alkoholičare bez insomnije (Nenadic Sviglin *i sur.*, 2011). Viša koncentracija 5-HT u trombocitima nađena je i kod veterana s PTSP-om sa psihotičnim karakteristikama (Pivac *i sur.*, 2006), a također je nađena i kod agresivnih nasilnih prijestupnika u Kini (Zhou *i sur.*, 2006).

### **1.7. Cilj istraživanja**

Cilj ovog diplomskog rada je utvrditi povezanost poremećaja spavanja s polimorfizmom 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik i koncentracijom trombocitnog serotonina u 393 hrvatskih ratnih muških veterana s post-traumatskim stresnim poremećajem (PTSP). Koliko mi je poznato ovo je prvo istraživanje povezanosti 5-HTTLPR polimorfizma u genu koji kodira za serotonininski prijenosnik s poremećajima spavanja potaknutim PTSP-om, a dobiveni rezultati trebali bi pridonijeti boljem razumijevanju uloge serotoniniskog sustava u neurobiološkoj podlozi PTSP-a.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 393 ratnih veterana muškog spola liječenih u Klinici za psihijatriju „Vrapče“, Zagreb, Hrvatska. Ispitanicima je od strane iskusnog psihijatra dijagnosticiran kronični posttraumatski stresni poremećaj (PTSP) uzrokovan borbenim iskustvom. Lijekove nisu koristili. Svi ispitanici su pripadnici bijele rase, hrvatskog podrijetla s aktivnom vojnom dužnosti, a bili su u hrvatskoj vojsci između 1991. i 1995. godine. Svi ispitanici imali su slična traumatska borbeno iskustva ( $3.0 \pm 1.0$  godina) i slično trajanje vremena koje je prošlo nakon traumatskog iskustva ( $6.1 \pm 2.7$  godina). Dijagnoze PTSP-a, komorbidnih psihijatrijskih poremećaja i različitih poremećaja spavanja procijenjene su od strane iskusnog psihijatra korištenjem Strukturiranog kliničkog intervjua (SCID) za DSM-IV prema DSM-IV kriterijima, Hamiltonove ljestvice za anksioznost (HAMA), Hamiltonove ljestvice za depresiju (HDRS) i Kliničke ljestvice za posttraumatski stresni poremećaj (CAPS). Svi sudionici su ispunili upitnik koji uključuje: temeljne demografske karakteristike, pušenje, konzumiranje alkohola, fizičku aktivnost, prisutnost akutnih i kroničnih fizičkih bolesti, povijest dijabetesa, hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti i korištenje lijekova. Kriterij za isključivanje: pozitivna obiteljska povijest psihijatrijskog poremećaja, ranija povijest akutne psihoze, demencija, kognitivna disfunkcija, mentalna retardacija, shizofrenija, poremećaji raspoloženja, poremećaji osobnosti, zloupotreba tvari, prijašnja ili sadašnja zloupotreba alkohola ili drugih tvari tijekom 3 mjeseca, klinički značajni poremećaji u elektrokardiogramu ili laboratorijskim nalazima i pozitivni urinski nalaz za nedopuštene droge i alkohol, simptomi akutne ili kronične fizikalne bolesti, povijest kardiovaskularnih ili neuroloških poremećaja, hipertenzija, dijabetes ili drugi metabolički i/ili endokrini poremećaj. Nakon što se sudionicima u potpunosti opisao protokol istraživanja, dobiven je pisani informirani pristanak. Sva istraživanja je odobrio Etički odbor Klinike za psihijatriju „Vrapče“ te su ona provedena u skladu s Helsinškom deklaracijom iz 1989. godine. Ispitanici sa PTSP-om su podijeljeni na one sa i bez komorbidne depresije. Nadalje veterani s PTSP-om su prema poremećajima spavanja podijeljeni na one sa i bez insomnije i drugih poremećaja spavanja (noćne more, isprekidani san) korištenjem HAMA, HDRS i CAPS skale. Prema HAMA točki 4, svi sudionici su imali blagu (1 bod), umjerenu (2 boda), jaku (3 boda) ili vrlo jaku (4 boda) insomniju. Simptomi insomnije uključivali su teškoće usnivanja, isprekidani san, nezadovoljavajući san i umor pri buđenju, snove, noćne more i noćne strahove.

**Tablica 1.** Ljestvice i bodovi prema kojima su veterani s PTSP-om podijeljeni u podskupine

<b>LJESTVICA</b>		<b>BODOVI</b>
<b>HAMA</b>	Točka 4 (insomnija)	1 - blaga
		2 - umjerena
		3 - jaka
		4 - vrlo jaka
<b>HDRS</b>	Točka 4 (rana insomnija)	0 – nema teškoća
		1 – žali se na povremene teškoće u uspavljivanju koje traju više od sat vremena
		2 – žali se da ne može zaspati tokom većeg dijela noći
	Točka 5 (srednja insomnija)	0 – nema teškoća
		1 – žali se na nemir i uznemirenost tijekom noći
		2 – ustaje tokom noći barem jednom, ali ne zbog mokrenja
	Točka 6 (kasna insomnija)	0 – nema teškoća
		1 – budi se u ranim satima, ali se vraća na spavanje
		2 - nakon ranog buđenja ne može ponovno zaspati
<b>CAPS</b>	Kriterij B2 (uznemirujući snovi)	0 – nema teškoća
		3, 4, 5, 6, 7, 8 - stupanj teškoća
	Kriterij D1 (teškoće uspavljivanja i spavanja)	0 – nema teškoća
		3, 4, 5, 6, 7 – stupanj teškoća

HAMA - Hamiltonova skala za anksioznost, HDRS - Hamiltonova skala za depresiju, CAPS - Klinička skala za posttraumatski stresni poremećaj

Kako bi se procijenilo imaju li ranu, srednju ili kasnu insomniju, svi sudionici podijeljeni su prema HDRS točkama 4, 5 i 6. Ispitanici su prema simptomima rane insomnije podijeljeni u one bez rane insomnije (0 bodova), one s povremenima teškoćama uspavljivanja koje traju više od sat vremena (1 bod), i u one s teškoćama uspavljivanja svake noći (2 boda). Veterani su prema HDRS točki 5 kategorizirani u one bez srednje insomnije (0 bodova), one uznemirene i bez odmora tijekom noći (1 bod) ili one koji se bude tijekom noći i izlaze iz kreveta, ali ne zbog mokrenja (2 boda). Sudionici su prema simptomima kasne insomnije podijeljeni u one bez kasne insomnije (0 bodova), one koji se bude u ranim jutarnjim satima, ali se vraćaju spavanju (1 bod) i veterane koji ne mogu ponovo zaspati nakon što su izašli iz kreveta (2 boda). Kako je PTSP karakteriziran uznemirujućim snovima vezanim uz traumatični događaj i teškoćama u uspavljivanju i spavanju, sudionici su također podijeljeni prema CAPS kriterijima B2 i D1 u veterane bez (0 bodova) ili sa (3, 4, 5, 6, 7 ili 8 bodova) uznemirujućim snovima (kriterij B2) i veterane bez (0 bodova) ili sa (3, 4, 5, 6 ili 7 bodova) teškoćama uspavljivanja i spavanja (kriterij D1) (tablica 1).

## **2.2. Određivanje koncentracije serotonina u trombocitima**

U psihijatrijskoj bolnici Vrapče, uzorci krvi (8 ml) sakupljeni su u plastične štrcaljke s 2 ml antikoagulansa ACD (engl. *Acid Citrate Dextrose - ACD*) u 8 sati ujutro nakon noćnog posta. Transportirani su u Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković. Tamo sam krv centrifugirala na 1831 x g, 3 min na sobnoj temperaturi kako bih dobila plazmu bogatu trombocitima (engl. *platelet-rich-plasma – PRP*). Daljnjim centrifugiranjem plazme bogate trombocitima u ohlađenoj (4 °C) centrifugi na 5087 x g, tijekom 15 min sedimentirani su trombociti. Talog sam isprala fiziološkom otopinom i ponovno centrifugirala. Istaložene trombocite pohranila sam u zamrzivaču na 20 °C. Koncentraciju trombocitnog serotonina odredila sam pomoću spektrofotometrijske metode. Talogu trombocita dodala sam 1.5 ml deionizirane vode (re H<sub>2</sub>O), talog podigla pipetom te vorteksirala, a nakon toga sam trombocite razbijala ultrazvukom (20 kHz, amplituda 8 x 10<sup>-3</sup> mm kroz 60 s). Razbijene trombocite, uzorke standarda i slijepe probe (re H<sub>2</sub>O) analizirala sam u duplikatima. Početnu otopinu 5-HT pripremila sam otapanjem 23.5 mg 5-HT u 50 ml 0,1 M HCl te sam iz nje napravila 5 standarda različitih koncentracija (2000 ng/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml i 63 ng/ml). U plastične epruvete dodala sam 1.2 ml suspenzije trombocita, a zatim redom u sve epruvete, uključujući i standarde i slijepe probe, dodala po 1 ml 5 % otopine ZnSO<sub>4</sub>. Odmah po dodatku ZnSO<sub>4</sub> svaki sam uzorak resuspendirala vorteks mješalicom i brzo dodavala 0,5 ml 1 M NaOH (na sobnoj temperaturi). Sadržaj sam dobro

izmiješala na vorteks miješalici, ostavila stajati 5 minuta, nakon čega sam centrifugirala 15 minuta na 5087 x g na 4 °C. Pipetom sam prebacila 2 ml supernatanta u set staklenih vatrostalnih epruveta te sam za pripremu fluorofora u deproteinizirane uzorke redom u sve epruvete dodavala po 0.2 ml otopine L-cisteina (0,1 %) i 1 ml 0.05 % otopine ortohtalaldehida (OPT). Epruvete sam uronila u kipuću vodu i kuhala 10 minuta. Tim postupkom pojačava se prirodna fluorescencija 5-HT koju sam mjerila na Varian Cary Eclipse spektrofiorimetru pri valnim duljinama od 345 nm (ekscitacija) i 485 nm (emisija). Pri zagrijavanju uzoraka, odnosno pri kuhanju u kipućoj vodi, dolazi do reakcije 5-HT i OPT-a pri čemu nastaje stabilni fluorofor. L-cistein sam dodala kako bi spriječio oksidaciju 5-HT. Koncentraciju 5-HT u uzorcima izračunavala sam prema standardima poznate koncentracije 5-HT nakon oduzimanja vrijednosti fluorescencije slijepe probe i izrazila u nmol po mg trombocitnih proteina koja se određuje metodom po Lowryju.

#### Kemikalije za određivanje koncentracije trombocitnog serotoninina:

- HCl (Kemika, 37 %, p.a.): 0.1 M otopina u re H<sub>2</sub>O i 1 M otopina u re H<sub>2</sub>O
- ZnSO<sub>4</sub> (Gram-Mol): 5 %-tna otopina u re H<sub>2</sub>O
- NaOH (Kemika): 1 M otopina u re H<sub>2</sub>O
- L-cistein (Sigma Aldrich): 0.1 %-tna otopina u 0.1 M HCl
- ortohtalaldehyd (OPT; Sigma Aldrich): 0.05 %-tna otopina u 1 M HCl
- 5-HT (Sigma Aldrich)

### **2.3. Određivanje koncentracije proteina**

Prije samog postupka određivanja koncentracije proteina metodom prema Lowryu, pripremila sam tzv. ABC smjesu te standarde različitih koncentracija. Kao standard koristi se otopina goveđeg serumskog albumina (engl. *Bovine Serum Albumin -BSA*) koja sam dobila otapanjem 5 mg BSA u 1 ml 0.1 M HCl iz koje sam pripremila 3 standarda različitih koncentracija (2.50 mg/ml, 1.25 mg/ml i 0.63 mg/ml). U praznu probu dodala sam 10 µl 0.1 M HCl. ABC otopinu pripremila sam miješanjem 140 ml 2 % otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.4 ml 2 % otopine K-Na tartarata i 1.4 ml 1 % otopine CuSO<sub>4</sub>. Sve uzorke, standarde i prazne probe, priredila sam u triplicatima. Kao uzorke koristila sam trombocite koje sam razbijala ultrazvukom (20 kHz, amplituda 8 x 10-3 mm kroz 60 s). U svaku epruvetu stavila sam 10 µl uzorka, standarda ili 0.1 M HCl, i na to sam dodala 2 ml ABC smjese. Smjesu sam ostavila stajati 10 minuta, a zatim sam dodala 0.2 ml Folin-Ciocalteu reagensa kojeg sam razrijedila vodom u omjeru 1:1. Nakon 30 minuta spektrofotometrijski sam mjerila apsorbanciju pri valnoj duljini od 700 nm.



#### Kemikalije za određivanje koncentracije proteina:

- HCl (Kemika, 37 %, p.a.): 0.1 M otopina u re H<sub>2</sub>O
- goveđi serumski albumin (BSA; Sigma Aldrich)
- ABC smjesa:
  - Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Kemika): 2 %-tna otopina u re H<sub>2</sub>O
  - CuSO<sub>4</sub> (Kemika): 1 %-tna otopina u re H<sub>2</sub>O
  - K-Na tartarat (Kemika): 2 %-tna otopina u reH<sub>2</sub>O
- Folin-Ciocalteu reagens (Sigma Aldrich)

#### **2.4. Izolacija DNA iz krvi**

Genomsku DNA izolirala sam iz periferne krvi pomoću metode isoljavanja (Miller *i sur.*, 1988). Nakon odmrzavanja, krv sam stavila na miješanje na roleru 16 minuta, a za to vrijeme sam označila po dva seta Eppendorf epruveta (1.5 ml). U Eppendorf epruvete sam otpipetirala 300 µl krvi i dodala 900 µl pufera za lizu eritrocita (eng. *red cell lysis buffer* – RCLB). Dobro sam izmješala na vorteks mješalici (20 sekundi) i ostavila 10 minuta stajati na ledu. Nakon toga sam centrifugirala 2 minute na 13 400 x g. Supernatant sam odlila, a talog po potrebi pročišćavala resuspendiranjem u puferu za lizu eritrocita i centrifugiranjem (2 minute na 13 400 x g). Na pročišćeni talog sam dodala 300 µl SE pufera, 30 µl 10 % SDS i 1.5 µl proteinaze K. Nakon toga je slijedila inkubacija uzoraka u vodenoj kupelji (1.5 do 2 sata na 56 °C) pri čemu su se lizirali leukociti. Nakon inkubacije, dodala sam 1/3 volumena (oko 120 µl) 5 M NaCl i sve skupa promiješala vorteks mješalicom 10 sekundi. Slijedilo je centrifugiranje 5 min na 12 000 x g kojom se DNA dobije u supernatantu, a ostali stanični dijelovi ostaju u talogu. Supernatant sam prelila u nove označene Eppendorf epruvete te mu dodala 2 volumena (oko 800 µl) hladnog izopropanola. Pritom je došlo do zgušnjavanja DNA koja je postala vidljiva u obliku netopivog spleta. Centrifugirala sam 2 minute na 12 000 x g, odlila supernatant i posušila Eppendorf epruvete na papiru, a na talog sam dodala 250 µl 75 % etanola. Opet sam centrifugirala 2 min na 12 000 x g. Odlila sam supernatant, lagano ocijedila Eppendorf ampulice na papiru te ih ostavila 15-30 min u termobloku na 37 °C kako bi se talog osušio. Na talog sam dodala 100 µl TE pufera pH 8.0. Uzorke sam ostavila oko sat vremena na 37 °C uz laganu trešnju kako bi se DNA dobro otopila, a nakon toga sam je pohranila na 4 °C. Koncentraciju i čistoću dobivene DNA određivala sam spektrofotometrijski pomoću uređaja NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific) na valnim duljinama 280 nm

odnosno 260 nm. Koncentracija DNA izolirane metodom iseljavanja iz 300  $\mu$ l pune krvi u TE puferu, iznosila je u prosjeku oko 100 ng/ $\mu$ l.

#### Kemikalije za izolaciju DNA:

- pufer za lizu eritrocita (engl. *Red Cell Lysis Buffer -RCLB*), pH 7.6:
  - 10 mM Tris (Sigma Aldrich)
  - 5 mM  $MgCl_2$  (Kemika)
  - 10 mM NaCl (Kemika)
- SE pufer (sodium EDTA), pH 8.0:
  - 75 mM NaCl (Kemika)
  - 25 mM  $Na_2EDTA$  (Fluka)
- NaCl (Kemika): 5 M otopina u re  $H_2O$
- proteinaza K (TaKaRa, 20 mg/ml)
- natrij dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate-SDS*; Sigma Aldrich): 10 % otopina
- etanol (Gram-Mol, min. 99.5 %, p.a.): 75 % otopina u re  $H_2O$
- izopropanol (Gram-Mol, min. 99.5 %, p.a.)
- TE pufer (Tris-EDTA), pH 7.6:
  - 10 mM Tris (Sigma Aldrich)
  - 1 mM EDTA (Fluka)

### **2.5. Lančana reakcija polimerazom**

Lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction-PCR*) korištena je kako bi se uspješno umnožili fragmenti genomske DNA koji sadrže gen za serotoninški prijenosnik (5-HTT). Izoliranu DNA sam odmrznula te pripremila DNA razrjeđenja u destiliranoj vodi kako bih u konačnici dobila 1-20 ng DNA po uzorku. Odpipetirala sam po 1.4  $\mu$ L pripremljenog uzorka DNA u PCR reakcijske ampulice i dodala 13.6  $\mu$ L reakcijske smjese. Reakcijska smjesa za PCR sastoji se od DNA kalupa, oligonukleotidnih početnica koje odgovaraju 3' i 5' krajevima regije koja se želi umnožiti na oba polinukleotidna lanca, dNTP-ova, uz dodatak termostabilne DNA-polimeraze. Za uspješno umnažanje potrebno je da je smjesa otopljena u puferu koji pogoduje korištenoj polimerazi, ali i da sadrži potrebnu količinu divalentnih kationa (obično  $Mg^{2+}$ ) potrebnih za povezivanje DNA kalupa s početnicama i polimerazom (tablica 2). Sekvenca početnica je prikazana u Tablici 3. Reakcijske ampulice sam zatvorila i kratko centrifugirala te stavila u PCR uređaj (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) i pokrenula proces umnažanja DNA prema uvjetima navedenim u tablici 4. Metoda se temelji

na ponavljanju ciklusa od 3 koraka. U prvom koraku dolazi do denaturacije DNA kalupa na temperaturi od 95 °C, odnosno odvajanja polinukleotidnih lanaca. U idućem koraku slijedi vezanje početnica na komplementarne dijelove DNA na 55 °C, nakon čega se temperatura diže na 72 °C kako bi se omogućilo termostabilnoj DNA-polimerazi da replicira DNA lance na koje su se vezale početnice dovoljno brzo i efikasno, a bez preuranjenog odvajanja početnica s kalupa. Cijeli se postupak ponavlja 40 puta. Na kraju zadanog broja ciklusa, smjesa se ostavi još određeni broj minuta na 72 °C kako bi se popunili svi potencijalno nedovršeni DNA lanci. Rezultat je eksponencijalno umnožena količina DNA.

Kemikalije za lančanu reakciju polimerazom:

- Dream Taq polimeraza (5 U/μl, Applied Biosystems)
- Dream Taq pufer (10 x, sa 25 mM MgCl<sub>2</sub>, Applied Biosystems)
- Q otopina (5 x, Qiagen)
- dNTP (100 mM, Roche)
- Oligonukleotidne početnice (25 μM, Sigma)
- miliQ H<sub>2</sub>O

**Tablica 2.** Sastav reakcijske smjese za PCR (ukupni volumen 15 μl)

SASTAV	V
MiliQ H <sub>2</sub> O	5.90 μl
10 x PCR pufer (Dream Taq polimeraza) (sadržava 25 mM MgCl <sub>2</sub> ) (Applied Biosystems, SAD)	1.50 μl
5 x Q otopina (Qiagen, Njemačka)	3.00 μl
dNTP mješavina: 10 μM dATP, dCTP, dTTP i dGTP (Applied Biosystems, SAD), 10 μM 7-deaza-dGTP (Roche, Njemačka)	1.50 μl
Oligonukleotidne početnice za 5-HTT (MWG Biotech, Njemačka): uzvodne (forward)	0.75 μl
Oligonukleotidne početnice za 5-HTT (MWG Biotech, Njemačka): nizvodne (reversed)	0.75 μl
Dream Taq polimeraza, 5 U/μl (Applied Biosystems, SAD)	0.20 μl

+ 1.4 μl  
DNA kalupa  
ispitanika

**Tablica 3.** Sekvence početnica za 5-HTT

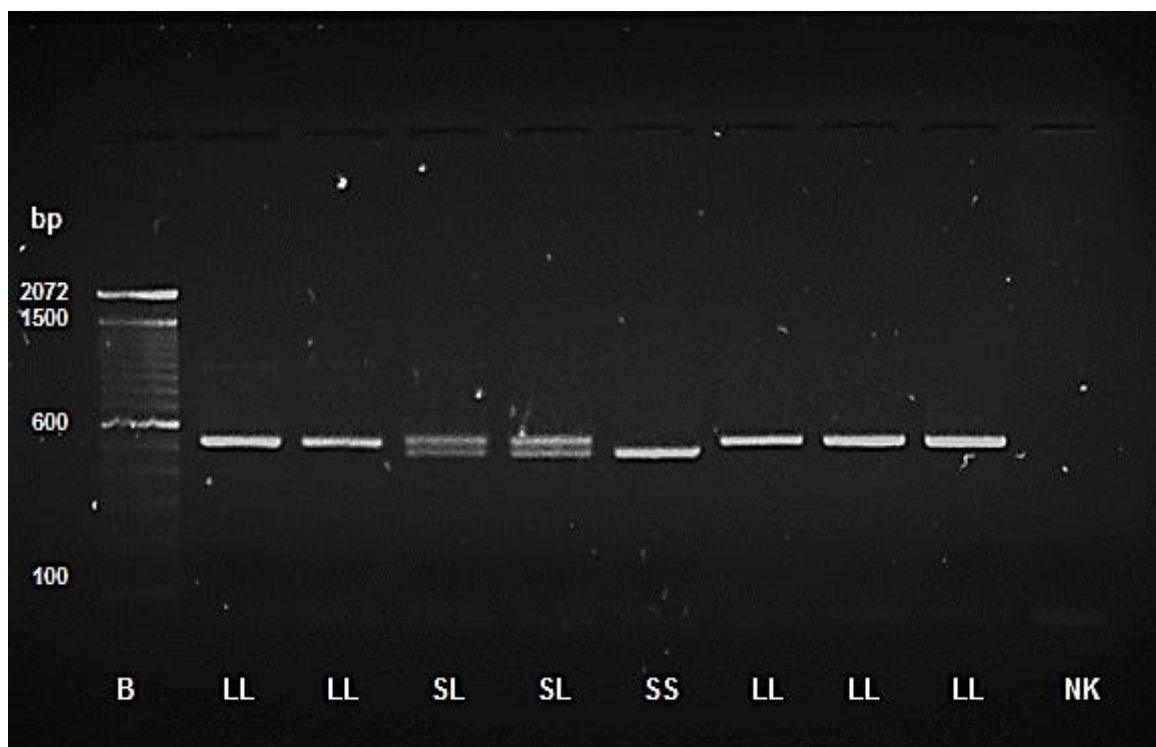
POČETNICA	SEKVENCA (5' – 3')
Uzvodna početnica (F)	GGCGTTGCCGCTCTGAATGC
Nizvodna početnica (R)	GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC

**Tablica 4.** Uvjeti lančane reakcije polimerazom

KORAK	TEMPERATURA	VRIJEME	} 40 ciklusa
Početna denaturacija	95 °C	3 min	
Denaturacija	95 °C	30 sec	
Vezivanje početnica	55 °C	30 sec	
Produljenje početnica	72 °C	1 min	
Završno produljenje	72 °C	5 min	
Čuvanje	4 °C	∞	

## 2.6. Elektroforeza na gelu agaroze

Za detekciju specifično umnoženih fragmenata DNA nakon PCR reakcije koristila sam elektroforezu na 2.5 % agaroznom gelu pripremljenom s tris-acetat-EDTA (TAE) puferom. Da bi se vizualizirali odsječci DNA, u gel sam prilikom izrade dodala boju SYBR® Safe prema uputama proizvođača. Za praćenje tijeka elektroforeze uzorke DNA pomiješala sam s puferom za nanošenje te nanijela u jažice pripremljenog gela. U jednu jažicu nanijela sam biljeg-100 pb DNA standard koji mi je poslužio za određivanje veličine fragmenata DNA (S alel -484 bp, a L alel 528 bp), dok sam u jednu jažicu nanijela negativnu kontrolu koja je sadržavala sve komponente reakcijske smjese osim uzorka DNA te koja je prošla isti postupak umnažanja lančanom reakcijom polimeraze. Elektroforeza se odvijala pri naponu od 90 V u trajanju od 45 minuta. Nakon elektroforeze razdvojene fragmente DNA na gelu vizualizirala sam pomoću UV transiluminatora (Uvitec BXT-20-M). Na slici 5 prikazana je tipična fotografija agaroznog gela na kojoj se mogu vidjeti razdvojeni fragmenti DNA standarda, uzoraka i negativne kontrole te kod uzoraka razlikovati homozigotni nositelji kratkog (S) alela, homozigotni nositelji dugog (L) alela i heterozigotni nositelji (nositelji S i L alela) polimorfizma 5-HTLLPR u genu za serotonininski prijenosnik.



Slika 5. Tipična fotografija agaroznog gela na kojoj se mogu vidjeti razdvojeni fragmenti i razlikovati homozigotni nositelji kratkog alela (SS), homozigotni nositelji dugog alela (LL) i heterozigotni nositelji (nositelji S i L alela) polimorfizma 5-HTLLPR u genu za serotoniniski prijenosnik; B-DNA biljeg, NK-negativna kontrola

Kemikalije za elektroforezu na gelu agaroze:

- agaroz (Type I-A: Low, SIGMA)
- biljeg-100 pb DNA standard (1 µg/µl, Invitrogen)
- pufer za nanošenje (eng. *Loading Buffer*) (6 x, sastav: 36 % glicerol, 0.05 % bromfenolno modrilo, 0.05 % ksilen glikol, 30 mM EDTA)
- Tris-acetat-EDTA (TAE) pufer (1 x):
  - 10 mM Tris-HCl (Sigma Aldrich)
  - 5 mM natrij-acetat (Fluka)
  - 0.5 mM EDTA (Fluka)
- boja SYBR® Safe (Invitrogen)

## 2.7. Statistička analiza podataka

Rezultate sam prikazala kao brojeve i postotke ili kao srednju vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Razlike u dobi, bodovima na HDRS, HAMA i CAPS ljestvicama te koncentraciji trombocitnog serotonina između dvije skupine analizirala sam Student t-testom u slučaju normalne raspodjele podataka ili primjenom Mann-Whitney U testa u slučaju kada podaci nisu bili normalno raspoređeni. Razlike između više skupina istražila sam pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) nakon koje je slijedio Tukeyev test multiple komparacije. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine prema tome jesu li LL homozigoti ili nositelji S alela (osobe s genotipom SS i SL) 5-HTTLPR polimorfizma u genu za serotoninski prijenosnik. Učestalost pojedinih alela ili genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u uzorku odredila sam pomoću  $\chi^2$ -testa.  $\chi^2$ -test sam također koristila za procjenu odstupanja raspodjele promatranih genotipova od Hardy-Weinbergerove ravnoteže. Standardizirane rezidualne (R) izračunala sam kako bi odredila koja kategorija je najviše doprinijela odbacivanju nulte hipoteze (Field *i sur.*, 2012). Kriterij za značajnost u svim testovima bio je  $p < 0.05$ . Sve statističke analize napravljene su pomoću programskog računalnog programa Sigmatat 2.0 (Jandell Scientific Corp. San Raphael, California, USA) i Microsoft Excel.

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Demografski i klinički podaci ispitanika

Od 393 veterana, njih 188 (47.8 %) imalo je PTSP, a 205 (52.2 %) imalo je PTSP s komorbidnom depresijom. Veterani s PTSP-om bez komorbidne depresije imali su znatno veći ukupan broj bodova na CAPS i HAMA ljestvicama, kao i broj bodova u točki 4 HAMA ljestvice te na točkama B2, D1 i D2 na ljestvici CAPS, od veterana s PTSP-om i depresijom. Veterani s PTSP-om i depresijom bili su znatno stariji i imali su značajno veći ukupni broj bodova na HDRS ljestvici i u točki 6 HDRS ljestvice od veterana s PTSP-om bez komorbidne depresije (Tablica 5).

**Tablica 5.** Demografske i kliničke osobine ispitanika s PTSP-om

	PTSP	PTSP sa komorbidnom depresijom
<b>Dob (godine)</b>	41.0 (38.0-48.0)	43.5 (39.0-50.0)
	U=22643.50; P=0.020	
<b>HDRS ukupni bodovi</b>	20.0 (16.0-26.0)	26.0 (23.0-30.0)
	U=28236.50; P<0.001	
<b>HDRS-3 bodovi</b>	2.0 (1.0-3.0)	2.0 (1.0-2.0)
	U=19465.50; P=0.656	
<b>HDRS-4 bodovi</b>	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-2.0)
	U=21872.50; P=0.054	
<b>HDRS-5 bodovi</b>	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-2.0)
	U=19757.00; P=0.836	
<b>HDRS-6 bodovi</b>	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-2.0)
	U=23209.50; P=0.001	
<b>HAMA ukupni bodovi</b>	28.0 (22.0 -34.5)	28.0 (23.0-29.0)
	U=17045.00; P=0.009	
<b>HAMA-4 bodovi</b>	2.0 (2.0-3.0)	2.0 (2.0-3.0)
	U=17338.50; P=0.010	
<b>CAPS ukupni bodovi</b>	79.0 (69.0-100.0)	70.0 (61.0-73.0)
	U=11435.00; P<0.001	
<b>CAPS-B2 bodovi</b>	6.0 (5.0-7.0)	5.0 (4.0-6.0)
	U=12440.50; P<0.001	

<b>CAPS-D1 bodovi</b>	6.0 (5.0-6.0)	5.0 (4.0-6.0)
	U=16479.00; P=0.001	
<b>CAPS-D2 bodovi</b>	5.0 (4.0-6.0)	4.0 (4.0-5.0)
	U=14818.50; P<0.001	

Podaci su prikazani kao medijan i 25. i 75. percentila u zagrada; Mann-Whitney U test; HDRS - Hamiltonova skala za depresiju; HAMA - Hamiltonova skala za anksioznost; CAPS - Klinička skala za posttraumatski stresni poremećaj

### 3.2. Učestalost pojavljivanja genotipova 5-HTTLPR polimorfizma u genu za serotonininski prijenosnik u ratnih veterana s PTSP-om

Kao što je prikazano u tablici 6., učestalosti pojavljivanja opaženih genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik u ispitanika oboljelih od PTSP-a bile su u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom ( $\chi^2=0.354$ ,  $p=0.552$ ).

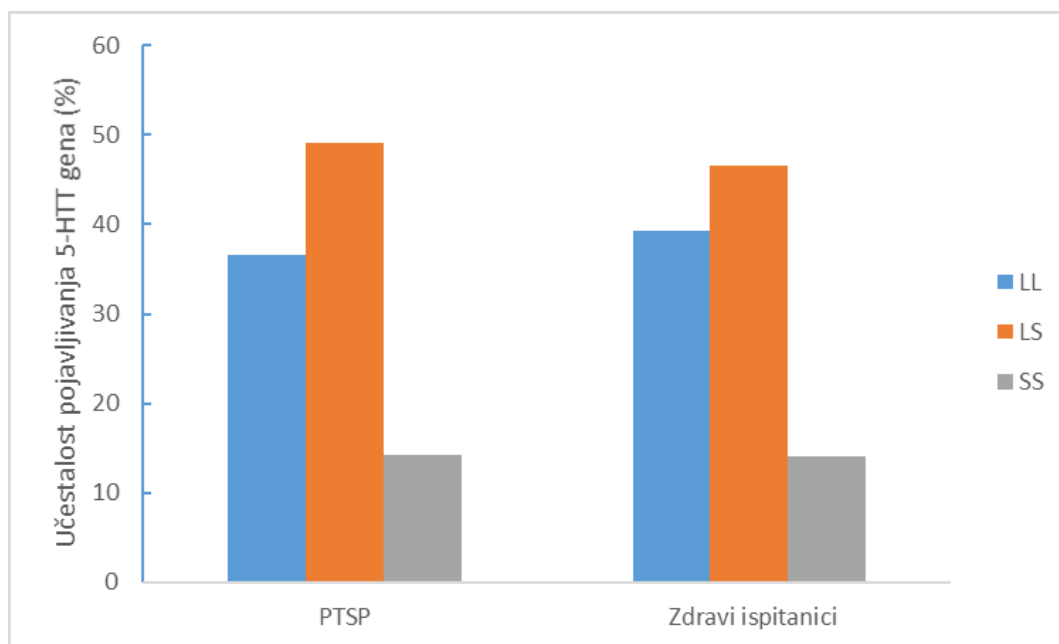
**Tablica 6. Dobivena i očekivana raspodjela genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik u ratnih veterana s PTSP-om**

Genotipovi		LL	LS	SS
<b>p = 0.552</b>	Dobiveno	120 (36.6 %)	161 (49.1 %)	47 (14.3 %)
	Očekivano	122.6 (31.2 %)	155.9 (39.7 %)	49.6 (12.6 %)

\*ukoliko je  $p < 0.05$  rezultat nije u skladu sa HW ravnotežom

Kako bi se procijenilo jesu li 5-HTTLPR varijante gena za serotonininski prijenosnik povezane s PTSP-om, raspodjela genotipova u 393 veterana s PTSP-om usporedila se najprije s raspodjelom genotipova u 433 zdravih kontrolnih ispitanika muškog spola hrvatskog podrijetla bez dijagnoze PTSP-a uključenih u prijašnjim istraživanjima (Pivac *i sur.*, 2009; Pivac *i sur.*, 2010). Rezultati su utvrdili da je učestalost pojavljivanja genotipova 5-HTTLPR polimorfizma u kontrolnih ispitanika bila LL (170, 39.3 %), LS (202, 46.6 %) i SS (61, 14.1 %) te se nije značajno razlikovala ( $\chi^2=0.59$ ,  $df=2$ ,  $p=0.745$ ) od raspodjele genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik u ispitanika oboljelih od PTSP-a (slika 6).





Slika 6. Raspodjela genotipova 5-HTTLPR polimorfizma u genu za serotonininski prijenosnik u ispitanika s PTSP-om i zdravih kontrolnih ispitanika. Nisu pronađene značajne razlike ( $\chi^2=0.59$ ,  $df=2$ ,  $p=0.745$ ).

Kada su veterani s PTSP-om podijeljeni na one bez i sa komorbidnom depresijom, dobivena raspodjela genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u veterana s PTSP-om, a bez komorbidne depresije, nije se značajno razlikovala od očekivane ( $\chi^2=0.0185$ ,  $p=0.892$ ), odnosno bila je u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom (tablica 7).

**Tablica 7. Dobivena i očekivana raspodjela genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik u ratnih veterana s PTSP-om bez komorbidne depresije**

Genotipovi		LL	LS	SS
<b>p = 0.892</b>	Dobiveno	73 (38.8 %)	89 (47.3 %)	26 (13.8 %)
	Očekivano	73.4 (39.0%)	88.1 (46.9 %)	26.4 (14.0 %)

\*ukoliko je  $p < 0.05$  rezultat nije u skladu sa HW ravnotežom

Kao što je prikazano u tablici 8, to je utvrđeno i za veterane s PTSP-om i komorbidnom depresijom, odnosno dobivena raspodjela genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u veterana s PTSP-om sa komorbidnom depresijom također se nije značajno razlikovala od očekivane ( $\chi^2=0.664$ ,  $p=0.415$ ), odnosno također je bila u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom.

**Tablica 8. Dobivena i očekivana raspodjela genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik u ratnih veterana s PTSP-om i komorbidnom depresijom**

Genotipovi		LL	LS	SS
<b>p = 0.415</b>	Dobiveno	71 (34.6 %)	104 (50.7 %)	30 (14.6 %)
	Očekivano	73.8 (36.0%)	98.4 (48.0 %)	32.8 (16.0 %)

\*ukoliko je  $p < 0.05$  rezultat nije u skladu sa HW ravnotežom

Raspodjela genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u veterana s PTSP-om nije se znatno razlikovala ( $\chi^2=0.77$ ,  $df=2$ ,  $p=0.680$ ) od raspodjele genotipova u veterana s PTSP-om i komorbidnom depresijom. Nadalje, učestalost nositelja S (kombinirani genotip SS i SL) u odnosu na homozigotni LL genotip ( $\chi^2=0.58$ ,  $df=1$ ,  $p=0.445$ ) nije bila značajno različita između veterana s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije.

### **3.3. Koncentracija trombocitnog serotonina i učestalost pojavljivanja genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u veterana s PTSP-om sa ili bez teškoća spavanja**

Veterani s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije podijeljeni su u grupe sa ili bez teškoća spavanja prema točkama 4, 5 i 6 HDRS ljestvice, točki 4 HAMA ljestvice, i točkama B2 i D1 CAPS ljestvice.

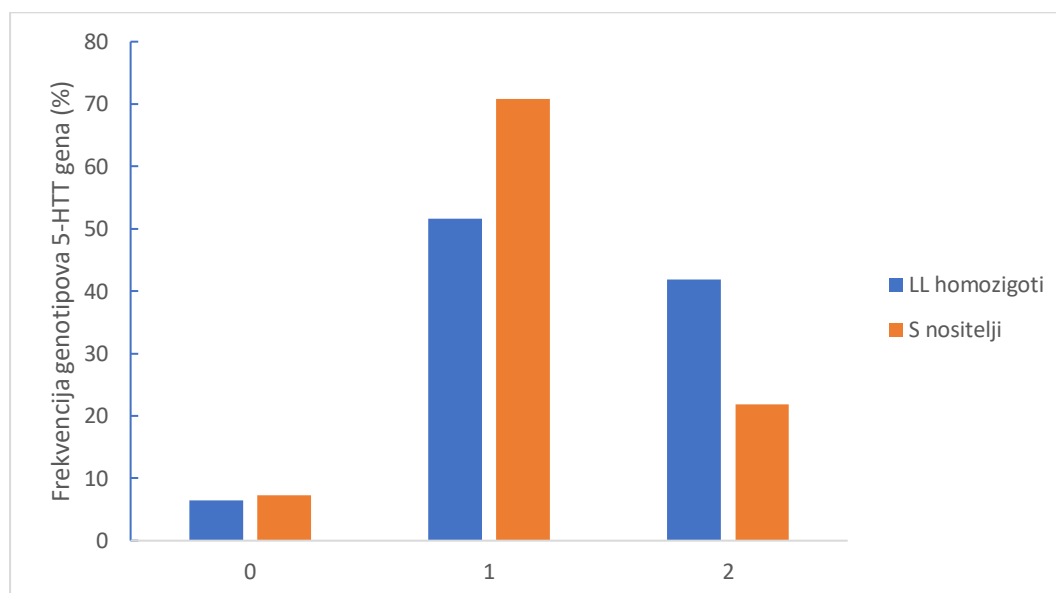
#### **3.3.1. Veterani s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije podijeljeni u grupe sa ili bez teškoća spavanja prema točkama 4, 5 i 6 HDRS ljestvice**

Prema točki 4 HDRS ljestvice (rana insomnija), postojala je značajna razlika ( $\chi^2=7.33$ ,  $df=2$ ,  $p=0.026$ ) u učestalosti LL homozigota i nositelja S alela između veterana s PTSP-om sa ili bez rane nesanice (tablica 9, slika 7). Ova je razlika bila posljedica veće učestalosti LL homozigotnog genotipa u skupini s ocjenom 2 na točki 4 HDRS ljestvice ( $R = 1.76$ ). U skupini ratnih veterana s PTSP-om i komorbidnom depresijom, učestalost LL homozigotnog genotipa i nositelja S alela nije se značajno razlikovala ( $\chi^2=0.86$ ,  $df=2$ ,  $p=0.650$ ) kada su branitelji podijeljeni prema rezultatima 0, 1 i 2 na točki 4 (rana nesanica) HDRS ljestvice (tablica 9).

**Tablica 9. Raspodjela genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u veterana s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije podijeljenih u one bez rane insomnije (0) i one s bodovima 1 ili 2 rane insomnije prema točki 4 HDRS ljestvice**

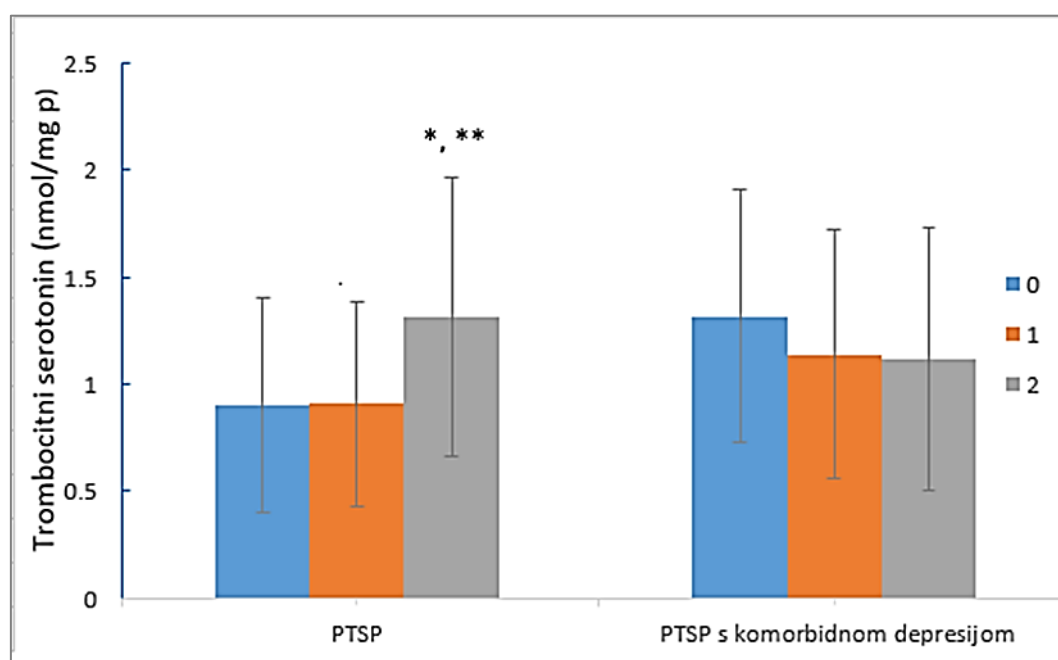
Bodovi točke 4 HDRS ljestvice		0	1	2
PTSP				
5-HTTLPR	LL homozigoti, <i>n</i> (%)	4 (6.5 %)	32 (51.6)	26 (41.9)
	S nositelji, <i>n</i> (%)	7 (7.3 %)	68 (70.8)	21 (21.9)
$\chi^2 = 7.33$ , <i>df</i> =2, <i>p</i> =0.026				
PTSP s komorbidnom depresijom				
5-HTTLPR	LL homozigoti, <i>n</i> (%)	3 (5.2)	34 (58.6)	12 (36.2)
	S nositelji, <i>n</i> (%)	3 (2.7)	63 (56.8)	45 (40.5)
$\chi^2 = 0.86$ , <i>df</i> =2, <i>p</i> =0.650				

0 - nema poteškoća u uspavlivanju, 1 - povremene teškoće u uspavlivanju koje traju više od pola sata, 2 - ne može zaspati tijekom većeg dijela noći



**Slika 7. Učestalost genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u veterana s PTSP-om bez depresije prema bodovima točke 4 HDRS ljestvice. 0 - nema teškoća, 1 - povremene teškoće u uspavlivanju koje traju više od sat vremena, 2 - ne može zaspati tijekom većeg dijela noći; Značajno ( $\chi^2=7.33$ , *df*=2, *p*=0.026) različita raspodjela LL homozigota i S nositelja (kombinirani SL i SS genotipovi) između veterana s PTSP-om sa ili bez rane nesanice.**

Veterani s PTSP-om i komorbidnom depresijom imali su značajno ( $t=2.35$ ,  $df=396$ ,  $p=0.019$ ) nižu ( $0.91 \pm 0.47$ ) koncentraciju trombocitnog serotonina u usporedbi s veteranima s PTSP-om bez komorbidne depresije ( $1.03 \pm 0.55$ ). ANOVA ( $F=11.69$ ,  $df=2,185$ ,  $p=0.001$ ) je utvrdila značajne razlike u koncentraciji trombocitnog serotonina u veterana s PTSP-om koji su podijeljeni prema točki 4 HDRS ljestvice. Naime, kao što je prikazano na slici 8, Tukeyjev post-hoc test pokazao je da su veterani s ranom insomnijom (2 boda) imali značajno višu koncentraciju trombocitnog serotonina od veterana bez rane insomnije (0 bodova) ( $p=0.015$ ) i od veterana s ranom insomnijom (1 bod) ( $p<0.001$ ). U grupi veterana sa PTSP-om i komorbidnom depresijom nije utvrđena značajna povezanost ( $F=0.55$ ,  $df=2,202$ ,  $p=0.581$ ) između koncentracije trombocitnog serotonina i rane insomnije određene prema točki 4 HDRS ljestvice (slika 8).



Slika 8. Koncentracija trombocitnog serotonina u veterana s PTSP-om i veterana s PTSP-om i komorbidnom depresijom podijeljenih prema vrijednostima rane insomnije (točka 4 HDRS ljestvice). 0 - nema poteškoća u uspavlivanju, 1 - povremene teškoće u uspavlivanju koje traju više od pola sata, 2 - ne može zaspati tijekom većeg dijela noći; \*  $p=0.015$  vs. veterani s PTSP-om s 0 bodova prema točki 4 HDRS ljestvice (Tukeyjev test); \*\*  $p<0.001$  vs. veterani s PTSP-om s 1 bodom prema točki 4 HDRS ljestvice (Tukeyjev test)

Prema točki 5 HDRS ljestvice (srednja insomnija) nisu nađene značajne razlike u koncentraciji trombocitnog serotonina niti u učestalosti pojavljivanja genotipova polimorfizma 5-HTTLPR između veterana s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije (tablica 10).

**Tablica 10. Koncentracija trombocitnog serotonina i učestalost pojavljivanja genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u veterana s PTSP-om, sa ili bez komorbidne depresije, podijeljenih u one bez srednje insomnije (0 bodova) i one sa srednjom insomnijom (1 ili 2 boda) prema točki 5 HDRS ljestvice (srednja insomnija)**

Bodovi točke 5 HDRS ljestvice		0	1	2
<b>PTSP</b>				
<b>Koncentracija trombocitnog 5-HT, srednja vrijednost (SD)</b>		1.06 (0.30)	0.98 (0.48)	1.09 (0.65)
<b>F=0.91; df=2, 185; p=0.405</b>				
<b>5-HTTLPR</b>	LL homozigoti, <i>n</i> (%)	0 (0.0)	43 (69.4)	19 (30.6)
	S nositelji, <i>n</i> (%)	1 (1.0)	56 (58.3)	39 (40.7)
<b><math>\chi^2=2.40</math>, df=2, p=0.301</b>				
<b>PTSP s komorbidnom depresijom</b>				
<b>Koncentracija trombocitnog 5-HT, srednja vrijednost (SD)</b>		/	0.94 (0.47)	0.85 (0.46)
<b>F=2.16; df=1,203; p=0.143</b>				
<b>5-HTTLPR</b>	LL homozigoti, <i>n</i> (%)	/	36 (62.1)	22 (37.9)
	S nositelji, <i>n</i> (%)	/	67 (60.4)	44 (39.6)
<b><math>\chi^2=0.00</math>, df=1, p=0.960</b>				

0 - nema poteškoća, 1 - nemir i uznemirenost tijekom noći, 2 - ustaje tijekom noći bar jednom

Također nisu nađene značajne razlike u koncentraciji trombocitnog serotonina i u učestalosti genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u veterana s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije kada su podijeljeni prema bodovima točke 6 (kasna insomnija) HDRS ljestvice (tablica 11).

**Tablica 11. Koncentracija trombocitnog serotonina i učestalost pojavljivanja genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u veterana s PTSP-om, sa ili bez komorbidne depresije, podijeljenih u one bez kasne insomnije (0 bodova) i one s kasnom insomnijom (1 ili 2 boda) prema točki 6 HDRS ljestvice (kasna insomnija)**

Bodovi točke 6 HDRS ljestvice		0	1	2
<b>PTSP</b>				
<b>Koncentracija trombocitnog 5-HT, srednja vrijednost (SD)</b>		0.92 (0.44)	0.98 (0.47)	1.15 (0.69)
<b>F=2.18; df=2,186; p=0.116</b>				
<b>5-HTTLPR</b>	LL homozigoti, <i>n</i> (%)	3 (4.8)	35 (56.5)	24 (38.7)
	S nositelji, <i>n</i> (%)	7 (7.3)	63 (65.6)	26 (27.1)
<b><math>\chi^2 = 2.48</math>, df=2, p=0.290</b>				
<b>PTSP s komorbidnom depresijom</b>				
<b>Koncentracija trombocitnog 5-HT, srednja vrijednost (SD)</b>		0.77 (0.14)	0.92 (0.47)	0.90 (0.47)
<b>F=0.19; df=2,202; p=0.827</b>				
<b>5-HTTLPR</b>	LL homozigoti, <i>n</i> (%)	1 (1.7)	33 (56.9)	24 (41.4)
	S nositelji, <i>n</i> (%)	2 (1.8)	53 (47.7)	56 (50.5)
<b><math>\chi^2 = 1.29</math>, df=2, p=0.525</b>				

0 - nema poteškoća, 1 - budi se u ranim satima, ali se vraća na spavanje, 2 - nakon ranog buđenja ne može ponovo zaspati

### 3.3.2. Veterani s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije podijeljeni u grupe sa ili bez teškoća spavanja prema točki 4 HAMA ljestvice

Prema bodovima točke 4 HAMA ljestvice (insomnija) nisu utvrđene značajne razlike u koncentraciji trombocitnog serotonina i u učestalosti genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u veterana s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije (tablica 12).

**Tablica 12. Koncentracija trombocitnog serotonina i učestalost pojavljivanja genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u veterana s PTSP-om, sa ili bez komorbidne depresije, podijeljenih prema bodovima (1, 2, 3 i 4) točke 4 HAMA ljestvice (insomnija)**

Bodovi točke 4 HAMA ljestvice		1	2	3	4
<b>PTSP</b>					
<b>Koncentracija trombocitnog 5-HT, srednja vrijednost (SD)</b>		0.99 (0.48)	1.05 (0.48)	1.02 (0.63)	0.99 (0.65)
<b>F=0.09, df=3,185; p=0.965</b>					
<b>5-HTTLPR</b>	LL homozigoti, <i>n</i> (%)	6 (9.7)	28 (45.2)	26 (41.9)	2 (3.2)
	S nositelji, <i>n</i> (%)	9 (9.3)	37 (38.1)	47 (48.5)	4 (4.1)
<b><math>\chi^2 = 0.89</math>, df=3, p=0.827</b>					
<b>PTSP s komorbidnom depresijom</b>					
<b>Koncentracija trombocitnog 5-HT, srednja vrijednost (SD)</b>		0.84 (0.53)	0.91 (0.45)	0.87 (0.50)	1.07 (0.54)
<b>F=0.50, df=3,202; p=0.680</b>					
<b>5-HTTLPR</b>	LL homozigoti, <i>n</i> (%)	2 (3.4)	41 (70.7)	12 (20.7)	3 (5.2)
	S nositelji, <i>n</i> (%)	2 (1.8)	82 (73.9)	23 (20.7)	4 (3.6)
<b><math>\chi^2 = 0.72</math>, df=3, p=0.869</b>					

1 - blaga insomnija, 2 - srednja insomnija, 3 - jaka insomnija, 4 - vrlo jaka insomnija

### 3.3.3. Veterani s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije podijeljeni u grupe sa ili bez teškoća spavanja prema kriteriju B2 i D1 CAPS ljestvice

Kao što je prikazano u tablici 13, nisu nađene značajne razlike u koncentraciji trombocitnog serotonina i u učestalosti pojavljivanja genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u veterana s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije, podijeljenim prema bodovima kriterija B2 CAPS ljestvice (ponavljajući uznemirujući snovi).

**Tablica 13. Koncentracija trombocitnog 5-HT i 5-HTTLPR genotipovi u veterana s PTSP-om, sa ili bez komorbidne depresije, podijeljenih u one bez uznemirujućih snova (0 bodova) i one s uznemirujućim snovima (bodovi 3, 4, 5, 6, 7 ili 8) prema kriteriju B2 CAPS ljestvice (ponavljajući uznemirujući snovi)**

Bodovi kriterija B2 CAPS ljestvice (uznemirujući snovi)		0	3	4	5	6	7	8
<b>PTSP</b>								
<b>Koncentracija trombocitnog 5-HT, srednja vrijednost (SD)</b>		1.11 (0.57)	0.98 (0.45)	1.91 (0.32)	1.03 (0.48)	1.01 (0.54)	1.15 (0.72)	0.49 (0.18)
<b>F=1.10; df=6,183; p=0.363</b>								
<b>5-HTTLPR</b>	LL homozigoti, n (%)	2 (3.2)	2 (3.2)	10 (16.1)	12 (19.4)	18 (29.0)	18 (29.0)	0 (0.0)
	S nositelji, n (%)	0 (0.0)	1 (1.0)	11 (11.3)	28 (28.9)	30 (30.9)	25 (25.8)	2 (2.1)
<b><math>\chi^2 = 7.58</math>, df=6, p=0.270</b>								
<b>PTSP s komorbidnom depresijom</b>								
<b>Koncentracija trombocitnog 5-HT, srednja vrijednost (SD)</b>		1.01 (0.70)	0.71 (0.42)	0.97 (0.43)	0.98 (0.44)	0.80 (0.50)	0.88 (0.28)	/
<b>F=1.90; df=5,199; p=0.096</b>								
<b>5-HTTLPR</b>	LL homozigoti, n (%)	0 (0.0)	3 (5.2)	11 (18.9)	28 (48.3)	13 (22.4)	3 (5.2)	/
	S nositelji, n (%)	6 (5.3)	13 (11.5)	28 (24.8)	38 (33.6)	22 (19.5)	6 (5.3)	/
<b><math>\chi^2 = 7.58</math>, df=5, p=0.181</b>								



Nadalje, nisu utvrđene značajne razlike u koncentraciji trombocitnog serotonina i u učestalosti pojavljivanja genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u veterana s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije, podijeljenim prema bodovima kriterija D1 CAPS ljestvice (teškoće uspavljivanja i spavanja).

**Tablica 14. Koncentracija trombocitnog 5-HT i genotipovi polimorfizma 5-HTTLPR u veterana s PTSP-om, sa ili bez komorbidne depresije, podijeljenih u one bez teškoća uspavljivanja i spavanja (0 bodova) i one s teškoćama uspavljivanja i spavanja (bodovi 3,4,5,6 ili 7) prema kriteriju D1 CAPS ljestvice (teškoće uspavljivanja i spavanja)**

Bodovi kriterija D1 CAPS							
ljestvice (teškoće spavanja i uspavljivanja)		0	3	4	5	6	7
PTSP							
<b>Koncentracija trombocitnog 5-HT, srednja vrijednost (SD)</b>		1.30 (0.00)	1.20 (0.57)	0.88 (0.37)	0.98 (0.45)	1.11 (0.56)	1.03 (0.90)
<b>F=1.04; df=4,184; p=0.388</b>							
<b>5-HTTLPR</b>	LL homozigoti, n (%)	0 (0.0)	2 (3.2)	8 (12.9)	22 (35.5)	27 (43.6)	3 (4.8)
	S nositelji, n (%)	1 (1.0)	0 (0.0)	11 (11.3)	24 (24.7)	50 (51.6)	11 (11.4)
<b><math>\chi^2=7.67</math>, df=5, p=0.175</b>							
PTSP s komorbidnom depresijom							
<b>Koncentracija trombocitnog 5-HT, srednja vrijednost (SD)</b>		/	0.90 (0.75)	0.88 (0.45)	0.94 (0.43)	0.87 (0.50)	1.02 (0.40)
<b>F=0.50; df=4,200; p=0.735</b>							
<b>5-HTTLPR</b>	LL homozigoti, n (%)	/	0 (0.0)	13 (22.4)	19 (32.8)	21 (36.2)	5 (8.6)
	S nositelji, n (%)	/	7 (6.3)	34 (30.6)	29 (26.1)	31 (28.0)	10 (9.0)
<b><math>\chi^2=6.03</math>, df=4, p=0.197</b>							

#### 4. RASPRAVA

Glavni nalaz ovog istraživanja je utvrđena značajna povezanost varijanti polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik i koncentracije trombocitnog serotonina s ranom nesanicom, ali ne i s ostalim poremećajima spavanja kod muških branitelja s PTSP-om bez komorbidne depresije. Raspodjela genotipova polimorfizma 5-HTTLPR bila je slična u veterana s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije, dok je koncentracija trombocitnog serotonina bila značajno niža u veterana s PTSP-om i komorbidnom depresijom u usporedbi s onima bez komorbidne depresije. Značajno veća koncentracija trombocitnog serotonina i značajno veća učestalost LL genotipa polimorfizma 5-HTTLPR u usporedbi s nositeljima S alela utvrđena je u veterana s PTSP-om sa simptomima rane nesаницe u usporedbi s veteranima bez rane nesаницe. S druge strane, za razliku od hipoteze ove studije, različiti poremećaji spavanja uključujući ranu nesanicu nisu bili značajno povezani s genotipovima polimorfizma 5-HTTLPR ili s promijenjenom koncentracijom trombocitnog serotonina u veterana s PTSP-om i komorbidnom depresijom. Osim toga, genotipovi polimorfizma 5-HTTLPR bili su slično raspoređeni u veterana s PTSP-om i u kontrolnim ispitanicima. Ovaj rezultat potvrđuje prethodna otkrića iz meta-analize koja nije utvrdila značajnu povezanost između PTSP-a i različitih varijanti polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik između 2.501 ispitanika s PTSP-om i 11.309 kontrolnih ispitanika (Navarro-Mateu *i sur.*, 2013).

Prema mom saznanju ovo je prvo istraživanje koje paralelno istražuje povezanost genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik i koncentracije trombocitnog serotonina s poremećajima spavanja u ispitanika s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije. Dosadašnji rezultati su potvrdili uključenost središnjeg serotonininskog sustava u regulaciji sna, i iako temeljni mehanizmi nisu u potpunosti razjašnjeni, smatra se da serotonin u dorzalnim rafama regulira druga područja koja sudjeluju u procesu spavanja i buđenja, kao što su retikularna jezgra talamusa i ventro-lateralno preoptično područje i tako modulira normalnu fiziologiju sna te se povećana serotonergična aktivnost povezuje s budnošću (Gottesmann, 2004; Hornung, 2003; Ursin, 2002). Središnja serotonergična aktivnost je značajno povezana s 5-HTTLPR funkcionalnim 44-bp insercijsko/delecijskim polimorfizmom smještenim u promotorskoj regiji gena za serotonininski prijenosnik. Varijanta S alela povezuje se sa značajno nižim razinama ekspresije serotonininskog prijenosnika, što rezultira u smanjenoj učinkovitosti transkripcije gena serotonininskog prijenosnika i smanjenom *in vitro* unosu serotonina u usporedbi s L alelom (Lesch *i sur.*, 1996).

Poremećaji spavanja su istaknuti i česti simptomi u PTSP-u (van Liempt, 2012) i depresiji (Franzen i Buysse, 2008). U ovoj studiji pokazalo se da LL genotip, koji je odgovoran za višu razinu ponovnog unosa serotonina u presinaptički završetak, odnosno smanjenu razinu serotonina u sinapsi, u usporedbi s genotipom SS, predstavlja čimbenik rizika za ranu nesanicu kod veterana s PTSP-om. Naime, značajno više LL homozigota nego nositelja S alela utvrđeno je u ispitanika s PTSP-om s ranom nesanicom. Ovi rezultati se slažu s podacima o višoj učestalosti L alela u usporedbi s S alelom u općoj populaciji s lošom kvalitetom sna (Barclay *i sur.*, 2011). Koliko mi je poznato, do sada nije istraživana povezanost polimorfizma 5-HTTLPR s PTSP-om induciranim poremećajima spavanja. LL genotip, odgovoran za višu razinu ponovnog unosa serotonina i smanjenu dostupnost serotonina u sinaptičkoj pukotini, mogao bi biti povezan s poremećenom prefrontalnom kontrolom u PTSP-u (Grabe *i sur.*, 2009) ili s više simptoma prekomjerne pobuđenosti u PTSP-u.

Međutim, S alel polimorfizma 5-HTTLPR bio je povezan s lošijom kvalitetom sna u drugim dijagnostičkim kategorijama, kao što je kronični stres kod odraslih primarnih skrbnika za supružnika ili roditelja s demencijom (Brummett *i sur.*, 2007). S alel bio je također znatno više zastupljen u rotirajućih radnika koji su radili u smjenama više od 60 mjeseci i koji su imali desinkronizirani cirkadijski ritam i poremećene obrasce sna i budnosti koji su rezultirali u poremećajima spavanja (Sookoian *i sur.*, 2007). Također, S alel je bio češći u skupini zdravih kineskih radnika s nesanicom (Huang *i sur.*, 2014) ili je bio prekomjerno zastupljen u bolesnika sa dijagnozom kronične primarne nesanice i psihofiziološke nesanice, prema DSM-IV i Međunarodnoj klasifikaciji poremećaja spavanja (Deuschle *i sur.*, 2010).

Objašnjenje neusklađenih rezultata moglo bi se tražiti u različitim dijagnostičkim skupinama, razlikama u procjeni kvalitete spavanja i faza spavanja, etničkim i spolnim razlikama te različitim razinama izloženosti stresu. Budući da je SS genotip polimorfizma 5-HTTLPR bio značajno povezan s nesanicom i agitacijom izazvanom fluoksetinom kod depresivnih bolesnika (Perlis *i sur.*, 2003), razlike u podacima iz literature mogu biti posljedica uključivanja ne-liječenih ispitanika (ova studija) naspram ispitanika koji su primali antidepresivnu terapiju. Također, jedno je moguće objašnjenje da su neki veterani s ranom nesanicom razvili apneju za vrijeme spavanja za koju je pokazano da je povezana s L-alelom polimorfizma 5-HTTLPR u kineskoj Han populaciji (Yue *i sur.*, 2008).

Osim toga, predisponirajući čimbenik za nesanicu je prekomjerna pobuđenost, dok je povećana reaktivnost na stres također predisponirajući čimbenik za nesanicu i prekomjernu pobuđenost (Harvey *i sur.*, 2014). U ovom istraživanju veterani s PTSP-om imali su značajno povećane

simptome uzbuđenja (tj. bodove na člancima D1 i B2 CAPS ljestvice) u usporedbi s veteranima koji su razvili PTSP kompliciran s komorbidnom depresijom, a ti su simptomi povezani s višom razinom stresa. Razina stresa utječe na nesanicu te je pokazano da je S alel kod zdravih kineskih radnika s niskom, ali ne i visokom razinom stresa, štitio od nesanice (Huang *i sur.*, 2014). Budući da u ovom istraživanju nisu procijenjene razine stresa vezanih uz posao, trenutačno se ne mogu potvrditi ovi rezultati. Povezanost polimorfizma 5-HTTLPR sa spavanjem može biti ovisna o spolu (Huang *i sur.*, 2014), ali mogući utjecaj spola isključen je u ovom istraživanju jer su u studiju uključeni samo muški vojnici Hrvatske vojske, dok su druga istraživanja uključivala sudionike oba spola (Brummett *i sur.*, 2007; Deuschle *i sur.*, 2010). Varijante polimorfizma 5-HTTLPR bile su povezane sa simptomima akutnog stresnog poremećaja i simptomima prekomjerne pobuđenosti i izbjegavanja u civilnih žrtava pucanja (Mercer *i sur.*, 2012) i sa simptomima prekomjerne podražljivosti u općoj populaciji izloženoj traumatskim događajima s većim rizikom razvoja PTSP-a (Grabe *i sur.*, 2009). Povezanost L alela i slabe kvalitete sna u općoj populaciji objašnjava se hipotezom da se S alel snažnije povezuje s poremećajima spavanja kod populacije s mentalnim poremećajima (Barclay *i sur.*, 2011).

Budući da u ovoj studiji ni PTSP, a niti PTSP s komorbidnom depresijom nisu bili povezani s poremećajima spavanja ili sa S alelom polimorfizma 5-HTTLPR, podaci ove studije nisu podržali tu hipotezu. Kod učenika s trajnim uzorkom kratkog sna, otkrivena je prekomjerna učestalost SS genotipa polimorfizma 5-HTTLPR u skupinama koje su prijavljivale kraće spavanje i više depresivno raspoloženje (Carskadon *i sur.*, 2012). Kako u ovoj studiji nisu otkrivene nikakve značajne razlike u učestalosti genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u veterana s PTSP-om i komorbidnom depresijom podijeljenim prema različitim poremećajima spavanja, rezultati ove studije nisu potvrdili da bi poremećaj spavanja izazvan nesanicom, stresom ili načinom života mogao predstavljati okolišni čimbenik, koji međudjeluje s genetskom ranjivošću i rezultira većim rizikom depresivnih simptoma (Carskadon *i sur.*, 2012). U skladu s rezultatima ove studije, učestalost genotipova polimorfizma 5-HTTLPR nije se razlikovala u bolesnika s depresivnim poremećajem sa ili bez hiperinsomnije izazvane paroksetinom (Murata *i sur.*, 2013). Nadalje, podaci o S alelu polimorfizma 5-HTTLPR kao čimbeniku rizika za razvoj PTSP-a ili depresije nisu bili konzistentni (Goejian *i sur.*, 2012). Svi ovi rezultati upućuju na to da su različiti poremećaji spavanja unutar različitih dijagnostičkih kategorija, zajedno s različitim razinama izloženosti stresu, povezani s različitim genotipovima polimorfizma 5-HTTLPR koji utječu na funkciju serotoniniskog prijenosnika.

Serotonergična aktivnost povezana je s regulacijom cirkadijskoga ritma, a mreža serotonergičnih živčanih završetaka u mozgu nalazi se u suprahijazmatičnoj jezgri koja regulira cirkadijske ritmove (Ursin, 2002). U ovom istraživanju utvrđena je periferna koncentracija serotonina, korištenjem trombocita kao ograničenog perifernog modela središnjeg metabolizma serotonina (Camacho i Dimsdale, 2000; Ehrlich *i sur.*, 2010; Yubero-Lahoz *i sur.*, 2013) u veteranima s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije i raznih poremećaja spavanja. Značajno viša koncentracija trombocitnog serotonina utvrđena je u ratnih veterana s PTSP-om s najistaknutijim simptomima rane nesanice u usporedbi s veteranima bez rane nesanice. Ovo otkriće suprotno je podacima o smanjenoj koncentraciji trombocitnog serotonina dobivenim u istraživanju na manjoj skupini veterana s PTSP-om i ranom nesanicom (Pivac *i sur.*, 2010), kao i podacima o sličnoj koncentraciji trombocitnog serotonina u veterana s PTSP-om sa ili bez depresije i poremećaja spavanja evaluiranih primjenom Montgomery-Asbergove ljestvice za depresiju (MADRS), (Muck-Seler *i sur.*, 2003). Ovi rezultati također su različiti od podataka koji pokazuju nižu koncentraciju trombocitnog serotonina u radnika koji rade u smjenama s problemima spavanja (Sookoian *i sur.*, 2007), kao i od podataka o smanjenoj koncentraciji trombocitnog serotonina u ispitanika s ovisnošću o alkoholu i nesanicom (Nenadic Sviglin *i sur.*, 2011).

Rezultati ove studije upućuju na to da je rana nesanica u PTSP-u (bez komorbidne depresije) povezana s većom koncentracijom trombocitnog serotonina. Rana nesanica izaziva poremećaje spavanja, povremene ili noćne poteškoće u uspjavanju te su stoga veterani s ranom insomnijom bili više uznemireni, ljutiti, agresivniji ili su imali više simptoma prekomjerne pobuđenosti nego veterani bez rane nesanice. To je u skladu s višom koncentracijom trombocitnog serotonina utvrđenom u veteranima s PTSP-om s psihotičnim značajkama (Pivac *i sur.*, 2006) ili u agresivnim nasilnim prekršiteljima (Zhou *i sur.*, 2006). Neočekivano, koncentracija trombocitnog serotonina nije bila povezana s poremećajima spavanja u skupini ispitanika s PTSP-om i komorbidnom depresijom, i taj je rezultat potvrdio prethodne rezultate dobivene na puno manjoj i različitoj skupini veterana s PTSP-om i depresijom (Muck-Seler *i sur.*, 2003). Nepsihotična depresija povezana je u ranijim studijama s nižom koncentracijom trombocitnog serotonina (Maurer-Spurej *i sur.*, 2007; Muck-Seler *i sur.*, 1996; Pivac *i sur.*, 1997), a u ovom istraživanju utvrđena je niža koncentracija trombocitnog serotonina u veterana s PTSP-om s komorbidnom depresijom u usporedbi s veteranima s PTSP-om bez depresije.

Budući da je rana nesanica bila povezana s povećanom koncentracijom trombocitnog serotonina, slična koncentracija trombocitnog serotonina u različitim poremećajima spavanja

možda je rezultat normalizacije koncentracije serotonina zbog komorbidne depresije u depresivnih veterana s PTSP-om i nesanicom. U ovom istraživanju koncentracija trombocitnog serotonina bila je povezana samo s komorbidnom depresijom, ali nije bila povezana s drugim poremećajima spavanja osim rane nesanice. Ovi rezultati su u skladu s onima koji pokazuju sličnu koncentraciju serotonina u punoj krvi u adolescenata sa ili bez poremećaja spavanja uzrokovanih epizodnim migrenama, budući da nije pronađena nikakva povezanost između koncentracije serotonina u cijeloj krvi i poremećaja spavanja ili ocjena na bilo kojoj psihološkoj ljestvici ili specifičnoj ljestvici spavanja (Pakalnis *i sur.*, 2009).

Ovi neusporedivi podaci mogu se objasniti znatno manjim brojem bolesnika koji su se koristili u ranijim istraživanjima, činjenicom da su se u ovoj studiji veterani podijelili prema komorbidnoj depresiji, primjenom različitih mjernih instrumenata i različitom osjetljivosti i specifičnosti HAMA, HDRS i MADRS ljestvica. Veća koncentracija trombocitnog serotonina u ranoj nesanici kod veterana s PTSP-om slaže se s većom učestalošću LL genotipa u skupini s ranom nesanicom. Budući da je LL genotip odgovoran za veći ponovni unos serotonina, više cirkulirajućeg serotonina se unosi iz krvi u trombocite i tamo pohranjuje.

Koncentracija trombocitnog serotonina nije bila utjecana s genotipom polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotoninški prijenosnik u veterana s PTSP-om podijeljenim prema genotipovima polimorfizma 5-HTTLPR i bodovima rane insomije. Međutim, veterani s PTSP-om s 2 boda na točki 4 HDRS ljestvice imali su veću koncentraciju trombocitnog serotonina u usporedbi s onima bez rane nesanice, što upućuje na to da su povećani bodovi nesanice, a ne genotip 5-HTTLPR polimorfizma, povezani s povećanom koncentracijom serotonina. Ovaj rezultat je u skladu s prethodnim podacima koji ne pokazuju značajnu povezanost između koncentracije trombocitnog serotonina i genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u zdravih kontrolnih ispitanika bijele rase (Pivac *i sur.*, 2009), ali se ne slaže s podacima dobivenim na mnogo manjoj skupini radnika u smjenama, gdje su nositelji genotipa SS imali niže razine trombocitnog serotonina nego nositelji LL ili LS genotipova (Sookoian *i sur.*, 2007). Razlike u dijagnozama, broju uključenih ispitanika, ali i u statističkoj snazi mogli su pridonijeti tim razlikama.

Ograničenja ovog istraživanja uključuju činjenicu da je studija presječna te da specifične ljestvice za mjerenje spavanja nisu korištene za procjenu poremećaja spavanja. Ispitanici su etnički bili Hrvati, pa se rezultati možda ne mogu generalizirati na sve populacije, a veličina uzorka možda nije bila dovoljna za otkrivanje malog učinka polimorfizma 5-HTTLPR na poremećaje spavanja. Istraživanje je provedeno za bialelne, a ne za trialelne genotipove

polimorfizma 5-HTTLPR gena za serotonininski prijenosik. Naime, A/G SNP (rs25531) utječe na L alel (Lipsky *i sur.*, 2009), a L<sub>G</sub> alel ima transkripcijsku aktivnost sličnu ekspresiji S alela, dok L<sub>A</sub> alel povećava transkripcijski učinak (Lipsky *i sur.*, 2009; Navarro-Mateu *i sur.*, 2013). Nedavna meta-analiza (Navarro-Mateu *i sur.*, 2013) pokazala je da trialelni pristup, koji uključuje 627 bolesnika s PTSP-om i 3.524 kontrolnih ispitanika, nije promijenio rezultate dobivene bialelnim pristupom (na 1.874 bolesnika s PTSP-om i 7.785 kontrolnih ispitanika), koji su evaluirani pomoću učestalosti alela, i primjenom dominantnog i recesivnog modela. Stoga razlike između bi- i trialelnih pristupa vjerojatno ne mijenjaju dobivene rezultate. S druge strane, prednosti ovog istraživanja obuhvaćaju procjenu dviju komponenti serotonininskog sustava u etnički homogenom bijelom stanovništvu hrvatskog podrijetla sa zajedničkom traumom te uključivanje ne-liječenih muških ratnih veterana sa PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije. Kako su podaci ove studije dobiveni na etnički homogenoj populaciji, oni se mogu koristiti u daljnjim meta-analizama, ali dobiveni rezultati trebaju potvrdu na većim skupinama ispitanika. Budući da nisu svi poremećaji spavanja bili povezani s odabranim komponentama serotonininskog sustava, potrebne su daljnje studije kako bi se razjasnila povezanost polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik s poremećajima spavanja u PTSP-u.

## 5. ZAKLJUČAK

1. Od 393 ispitanika uključenih u istraživanje, 188 (47.8 %) imalo je PTSP, a 205 (52.2 %) PTSP s komorbidnom depresijom. Ispitanici s PTSP-om bez depresije imali su veći ukupni broj bodova na CAPS i HAMA ljestvicama te broj bodova točke 4 HAMA ljestvice i točaka B2, D1 i D2 CAPS ljestvice, od veterana s PTSP-om i depresijom. Ispitanici s PTSP-om i depresijom bili su stariji i imali su veći ukupni broj bodova na HDRS ljestvici i broj bodova u točki 6 HDRS ljestvice od veterana s PTSP-om bez depresije.
2. Učestalost pojavljivanja genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik bila je u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom u svih ispitanika sa PTSP-om, kao i kad su podijeljeni u veterane s PTSP-om s i bez komorbidne depresije.
3. Raspodjela genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik nije se značajno razlikovala između ispitanika sa PTSP-om i kontrolnih ispitanika, kao niti između veterana s PTSP-om s i bez komorbidne depresije.
4. Postojala je značajna razlika u učestalosti LL homozigota i nositelja S alela polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik između veterana s PTSP-om sa i bez rane nesanice (točka 4 HDRS ljestvice), dok navedene razlike nisu utvrđene u veterana s PTSP-om i komorbidnom depresijom.
5. Veterani s PTSP-om i komorbidnom depresijom imali su nižu koncentraciju trombocitnog serotonina od veterana s PTSP-om bez komorbidne depresije.
6. Prema točki 4 HDRS ljestvice, veterani s PTSP-om i s ranom insomnijom (2 boda) imali su značajno višu koncentraciju trombocitnog serotonina od veterana bez rane insomnije (0 bodova) i od veterana s ranom insomnijom (1 bod), dok navedene razlike nisu utvrđene u ispitanika s PTSP-om i komorbidnom depresijom.
7. Nisu utvrđene značajne razlike u koncentraciji trombocitnog serotonina i u učestalosti genotipova polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik u veterana s PTSP-om sa ili bez komorbidne depresije kada su podijeljeni prema bodovima točke 5 (srednja insomnija) i točke 6 (kasna insomnija) HDRS ljestvice, prema bodovima točke 4 (insomnija) HAMA ljestvice, kao niti prema bodovima kriterija B2 (ponavljajući uznemirujući snovi) i D1 (teškoće uspavlivanja i spavanja) CAPS ljestvice.
8. Potrebne su daljnje studije na više ispitanika da bi se razjasnila povezanost polimorfizma 5-HTTLPR u genu za serotonininski prijenosnik s poremećajima spavanja u PTSP-u.



## 6. LITERATURA

- American Psychiatric Association (2013). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. Washington DC: American Psychiatric Association.
- Barclay NL, Eley TC, Mill J, Wong CCY, Zavos HMS, Archer SN, *i sur.* (2011). Sleep quality and diurnal preference in a sample of young adults: Associations with 5HTTLPR, PER3, and CLOCK 3111. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* **156**: 681–690.
- Brady KT, Killeen TK, Brewerton T, Lucerini S (2000). Comorbidity of psychiatric disorders and posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry* **61**: 22-32.
- Brummett BH, Krystal AD, Ashley-Koch A, Cynthia M, Züchner S, Siegler IC, *i sur.* (2007). NIH Public Access. *Psychosom Med* **69**: 621–624.
- Camacho A, Dimsdale JE (2000). Platelets and psychiatry: lessons learned from old and new studies. *Psychosom Med* **62**: 326–36.
- Canli T, Lesch K-P (2007). Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nat Neurosci* **10**: 1103–1109.
- Caron MG, Gether U (2016). Structural biology: antidepressants at work. *Nature* **532**: 320–321.
- Carskadon MA, Sharkey KM, Knopik VS, McGeary JE (2012). Short sleep as an environmental exposure: a preliminary study associating 5-HTTLPR genotype to self-reported sleep duration and depressed mood in first-year university students. *Sleep* **35**: 791–6.
- Davis LL, Clark DM, Kramer GL, Moeller FG, Petty F (1999). D-fenfluramine challenge in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* **45**: 928-30.
- Deuschle M, Schredl M, Schilling C, Wüst S, Frank J, Witt SH, *i sur.* (2010). Association between a serotonin transporter length polymorphism and primary insomnia. *Sleep* **33**: 343–7.
- Ehrlich S, Franke L, Scherag S, Burghardt R, Schott R, Schneider N, *i sur.* (2010). The 5-HTTLPR polymorphism, platelet serotonin transporter activity and platelet serotonin content in underweight and weight-recovered females with anorexia nervosa. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **260**: 483–490.
- Faul F, Erdfelder E, Lang A G, Buchner A (2007). G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* **39**: 175-191.

- Field AP, Miles J, Field F (2012). *Discovering statistics using R*. SAGE Publications, Ltd., London, UK.
- Franzen PL, Buysse DJ (2008). Sleep disturbances and depression: risk relationships for subsequent depression and therapeutic implications. *Dialogues Clin Neurosci* **10**: 473–81.
- Furlong RA, Ho L, Walsh C, Rubinsztein JS, Jain S, Paykel ES, *i sur.* (1998). Analysis and meta-analysis of two serotonin transporter gene polymorphisms in bipolar and unipolar affective disorders. *Am J Med Genet* **81**: 58–63.
- Gallopín T, Fort P, Eggermann E, Cauli B, Mu M (2000). Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature* **404**: 3–6.
- Gallopín T, Luppi PH, Cauli B, Urade Y, Rossier J, Hayaishi O, *i sur.* (2005). The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A2A receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuroscience* **134**: 1377–1390.
- Gelernter J, Cubells JF, Kidd JR, Pakstis AJ, Kidd KK (1999). Population studies of polymorphisms of the serotonin transporter protein gene. *Am J Med Genet* **88**: 61–66.
- Goenjian AK, Bailey JN, Walling DP, Steinberg AM, Schmidt D, Dandekar U, *i sur.* (2012). Association of TPH1, TPH2, and 5HTTLPR with PTSD and depressive symptoms. *J Affect Disord* **140**: 244–252.
- Gottesmann C (2004). Brain inhibitory mechanisms involved in basic and higher integrated sleep processes. *Brain Res Rev* **45**: 230–249.
- Grabe HJ, Spitzer C, Schwahn C, Marcinek A, Frahnöw A, Barnow S, *i sur.* (2009). Serotonin transporter gene (SLC6A4) promoter polymorphisms and the susceptibility to posttraumatic stress disorder in the general population. *Am J Psychiatry* **166**: 926–933.
- Hariri AR, Mattay VS, Tessitore A, Kolachana B, Fera F, Goldman D, *i sur.* (2002). Serotonin Transporter Genetic Variation and the Response of the Human Amygdala. *Science* **297**: 400–403.
- Harvey AG, Jones C, Schmidt DA (2003). Sleep and posttraumatic stress disorder: A review. *Clin Psychol Rev* **23**: 377–407.
- Harvey C-J, Gehrman P, Espie CA (2014). Who is predisposed to insomnia: A review of familial aggregation, stress-reactivity, personality and coping style. *Sleep Med Rev* **18**: 237–247.
- Hornung J-P (2003). The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat* **26**: 331–43.

- Huang C, Li J, Lu L, Ren X, Li Y, Huang Q, *i sur.* (2014). Interaction between serotonin transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) and job-related stress in insomnia: A cross-sectional study in Sichuan, China. *Sleep Med* **15**: 1269–1275.
- Hu X-Z, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, *i sur.* (2006). Serotonin Transporter Promoter Gain-of-Function Genotypes Are Linked to Obsessive-Compulsive Disorder. *Am J Hum Genet* **78**: 815–826.
- Jacobs BL (1991). Serotonin and behaviour: emphasis on motor control. *J Clin Psychiatry* **52**: 17-23.
- Judaš M, Kostović I (2001) Temelji neuroznanosti, 1. online izdanje. MF Zagreb – HIIM web stranica (<http://www.hiim.hr>)
- Kolassa IT, Ertl V, Eckart C, Glöckner F, Kolassa S, Papassotiropoulos A, *i sur.* (2010). Association study of trauma load and SLC6A4 promoter polymorphism in posttraumatic stress disorder: Evidence from survivors of the Rwandan genocide. *J Clin Psychiatry* **71**: 543–547.
- Kuch K, Cox BJ (1992). Symptoms of PTSD in 124 survivors of the Holocaust. *Am J Psychiatry* **149**: 337–340.
- Landolt HP, Wehrle R (2009). Antagonism of serotonergic 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptors: Mutual improvement of sleep, cognition and mood? *Eur J Neurosci* **29**: 1795–1809.
- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, *i sur.* (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* **274**: 1527–31.
- Lesch KP, Gutknecht L (2005). Pharmacogenetics of the serotonin transporter. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* **29**: 1062–1073.
- Liempt S van (2012). Sleep disturbances and PTSD: a perpetual circle? *Eur J Psychotraumatol* **3**: 19142.
- Lipsky RH, Hu X-Z, Goldman D (2009). Additional functional variation at the SLC6A4 gene. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* **150B**: 153–153.
- Maurer-Spurej E, Pittendreigh C, Misri S (2007). Platelet serotonin levels support depression scores for women with postpartum depression. *J Psychiatry Neurosci* **32**: 23–9.
- Mercer KB, Orcutt HK, Quinn JF, Fitzgerald CA, Conneely KN, Barfield RT, *i sur.* (2012). Acute and posttraumatic stress symptoms in a prospective gene x environment study of a university campus shooting. *Arch Gen Psychiatry* **69**: 89–97.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 1215.

- Murata Y, Kamishioiri Y, Tanaka K, Sugimoto H, Sakamoto S, Kobayashi D, *i sur.* (2013). Severe sleepiness and excess sleep duration induced by paroxetine treatment is a beneficial pharmacological effect, not an adverse reaction. *J Affect Disord* **150**: 1209–1212.
- Mück-Šeler D, Jakovljević M, Pivac N (1996). Platelet 5-HT concentrations and suicidal behaviour in recurrent major depression. *J Affect Disord* **39**: 73–80.
- Mück-Šeler D, Pivac N, Jakovljević M, Šagud M, Mihaljević-Peleš A (2003). Platelet 5-HT concentration and comorbid depression in war veterans with and without posttraumatic stress disorder. *J Affect Disord* **75**: 171–179.
- Navarro-Mateu F, Escámez T, Koenen KC, Alonso J, Sánchez-Meca J (2013). Meta-Analyses of the 5-HTTLPR Polymorphisms and Post-Traumatic Stress Disorder. *Plos One* **8**: e66227.
- Nenadić Sviglin K, Nedić G, Nikolac M, Mustapić M, Muck-Šeler D, Borovečki F, *i sur.* (2011). Insomnia, platelet serotonin and platelet monoamine oxidase in chronic alcoholism. *Neurosci Lett* **500**: 172–176.
- Noskova T, Pivac N, Nedić G, Kazantseva A, Gaysina D, Faskhutdinova G, *i sur.* (2008). Ethnic differences in the serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) in several European populations. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* **32**: 1735–1739.
- Pakalnis A, Splaingard M, Splaingard D, Kring D, Colvin A (2009). Serotonin Effects on sleep and emotional disorders in adolescent migraine. *Headache J Head Face Pain* **49**: 1486–1492.
- Perlis RH, Mischoulon D, Smoller JW, Wan YJY, Lamon-Fava S, Lin KM, *i sur.* (2003). Serotonin transporter polymorphisms and adverse effects with fluoxetine treatment. *Biol Psychiatry* **54**: 879–883.
- Pigeon WR, Campbell CE, Possemato K, Ouimette P (2013). Longitudinal relationships of insomnia, nightmares, and PTSD severity in recent combat veterans. *J Psychosom Res* **75**: 546–550.
- Pivac N, Jakovljević M, Mück-Šeler D, Brzović Z (1997). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and platelet serotonin concentrations in depressed patients. *Psychiatry Res* **73**: 123–32.
- Pivac N, Kozarić-Kovačić D, Mustapić M, Dezeljin M, Borovečki A, Grubišić-Ilić M, *i sur.* (2006). Platelet serotonin in combat related posttraumatic stress disorder with psychotic symptoms. *J Affect Disord* **93**: 223–227.

- Pivac N, Nedić G, Mustapić M, Babić A, Stipčević T, Borovečki F, Hajnsek S, Muck-Šeler D (2009). The lack of genotype-phenotype relationship between platelet serotonin concentration and serotonin transporter gene promoter polymorphism in healthy subjects. *Neurosci. Lett.* **462**: 45-48.
- Pivac N, Nedić G, Nikolac M, Nenadić-Sviglin K, Kozarć-Kovačić D, Mustapić M, Kovačić Z, Grubišić-Ilić M, Borovečki F, Hajnsek S, Muck-Šeler D (2010). Sleep disturbances and serotonergic markers in psychiatric disorders. In: Columbus, A.M. (Ed.), *Advances in Psychology Research*. Nova Science Publisher, New York, pp. 1-85.
- Sakai K, Crochet S (2001). Differentiation of presumed serotonergic dorsal raphe neurons in relation to behavior and wake-sleep states. *Neuroscience* **104**: 1141–1155.
- Sangare A, Dubourget R, Geoffroy H, Gallopin T, Rancillac A (2016). Serotonin differentially modulates excitatory and inhibitory synaptic inputs to putative sleep-promoting neurons of the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuropharmacology* **109**: 29–40.
- Serretti A, Calati R, Mandelli L, Ronchi D De (2006). Serotonin transporter gene variants and behavior: a comprehensive review. *Curr Drug Targets* **7**: 1659–69.
- Sherin JE, Nemeroff CB (2011). Post-traumatic stress disorder: The neurobiological impact of psychological trauma. *Dialogues Clin Neurosci* **13**: 263–278.
- Sookoian S, Gemma C, Gianotti TF, Burgueno A, Alvarez A, Gonzalez CD, *i sur.* (2007). Serotonin and serotonin transporter gene variant in rotating shift workers. *Sleep* **30**: 1049–1053.
- Ursin R (2002). Serotonin and sleep. *Sleep Med Rev* **6**: 55–69.
- Wang Z, Baker DG, Harrer J, Hamner M, Price M, Amstadter A (2011). The relationship between combat-related posttraumatic stress disorder and the 5-HTTLPR/rs25531 polymorphism. *Depress Anxiety* **28**: 1067–1073.
- Yubero-Lahoz S, Robledo P, Farré M, de la Torre R (2013). Platelet SERT as a peripheral biomarker of serotonergic neurotransmission in the central nervous system. *Curr Med Chem* **20**: 1382-1396.
- Yue W, Liu H, Zhang J, Zhang X, Wang X, Liu T, *i sur.* (2008). Association study of serotonin transporter gene polymorphisms with obstructive sleep apnea syndrome in Chinese Han population. *Sleep* **31**: 1535–41.
- Zhou J, Wang X, Li L, Cao X, Xu L, Sun Y (2006). Plasma serotonin levels in young violent offenders: Aggressive responding and personality correlates. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* **30**: 1435–1441.

Web stranice:

<https://atlasofscience.org/serotonin-and-sleep-regulation-cellular-and-molecular-mechanisms/>

(26. 05. 2017.)

## **7. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 14. travnja 1994. godine u Zadru. Gimnaziju Jurja Barakovića, a paralelno s time i Srednju glazbenu školu Blagoja Berse, završila sam u Zadru 2012. godine. Iste godine upisala sam na Odjelu za biologiju Sveučilišta u Osijeku preddiplomski studij biologije, znanstveni smjer, koji sam završila 2015. godine. Godine 2015. upisujem diplomski studij eksperimentalne biologije, modul fiziologija i imunobiologija, na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.